

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

MENTION « PHARMACIE »

par

CHRISTIAN JACQUES FARON

PHARMACIEN

né à Nancy le 7 Février 1932

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPORTEMENT D'UNE LEVURE

(CANDIDA UTILIS)

DANS DES MILIEUX DE TENEUR VARIABLE

EN CHLORURE DE SODIUM

Soutenue le 24 Octobre 1959
devant la Commission d'Examen

Président.....	M. le Doyen F. KAYSER
Juges.....	{ M. R. FRANQUET, Professeur
	{ M ^{lle} S. BESSON, Professeur

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

EN PHARMACIE

par

CHRISTIAN JACQUES FARON

PHARMACIEN

né le 10 mars 1927 à Nancy

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPORTEMENT D'UNE LEVURE

(CANDIDA UTILIS)

DANS DES MILIEUX DE TENEUR VARIABLE

EN CHLORURE DE SODIUM



Soutenue le 24 Octobre 1959
devant la Commission d'Examen

Président : M. le Docteur F. FAYON
Rapporteur : M. R. FORTICHER, Pharmacien
M. S. BENOÎT, Pharmacien

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

MENTION « PHARMACIE »

par

CHRISTIAN JACQUES FARON

PHARMACIEN

né à Nancy le 7 Février 1932

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPORTEMENT D'UNE LEVURE

(CANDIDA UTILIS)

DANS DES MILIEUX DE TENEUR VARIABLE

EN CHLORURE DE SODIUM



Soutenue le 24 Octobre 1959
devant la Commission d'Examen

Président..... M. le Doyen F. KAYSER
Juges..... { M. R. FRANQUET, *Professeur*
 { M^{lle} S. BESSON, *Professeur*

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

MENTION « PHARMACIE »

par

CHRISTIAN JACQUES FARON

PHARMACIEN

Né à Nancy le 7 février 1932

Digitized by the Internet Archive
in 2026

DANS DES MILIEUX DE TENEUR VARIABLE
EN CHLORURE DE SODIUM

Soutenue le 24 Octobre 1959
devant la Commission d'examen

Président..... M. le Docteur F. KAYSER
M. R. FRANQUET, Professeur
Juges..... M. S. BESON, Professeur

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE

N....

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle	FRANCOIS M. Th.	Matière Médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences naturelles
	BLOCH J.M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Mlle	BESSON S.	Pharmacodynamie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M.	BENE R.	Microbiologie
----	---------	---------------

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie-minéralogie
	BLOCH J.M.	Chimie minérale
	SOLEIL J.	Chimie organique
	BERNANOSE A.	Optique et Acoustique
Mlle	BESSON S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses

M.	GRANGER R. (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
MM.	BENE R.	Bactériologie
	ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels
Mme	LASSEUR A.	Techniques spéciales d'ana- lyses bactériologiques
MM.	MIRJOLET M.	Chimie analytique
	PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique

CHEFS DE TRAVAUX

M.	ANZIANI P.	Chimie
Mme	LASSEUR A.	Microbiologie-Parasitologie
MM.	MIRJOLET M.	Sciences pharmaceutiques
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	VILLOUTREIX J. (délégué)	Micrographie
	PELT J.M. (délégué)	Chimie
Mlle	GIRARD Th. (déléguée)	Microbiologie

Doyen honoraire: M. RICHARD, Recteur de l'Académie de MONTPELLIER.

Professeur honoraire : M. CORDEBARD.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

A MES PARENTS

Témoignage d'affection et de reconnaissance

A MA FEMME

A MA FILLE

A TOUS LES MIENS.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR le PROFESSEUR KAYSER
Doyen de la Faculté de Pharmacie

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR FRANQUET
Professeur de Botanique

MADemoiselle BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

A TOUS MES MAITRES
de la Faculté de Pharmacie de Nancy

HOMMAGE RESPECTUEUX ET RECONNAISSANT.

- A V A N T P R O P O S -
=====

En apprenant le cours de Chimie Biologique que nous faisait Monsieur le Doyen F. KAYSER, nous avons été particulièrement frappé par un travail de CONWAY, cité par notre Maître: possibilité d'obtenir des levures dont le potassium pouvait être presque totalement remplacé par le sodium, et qui, cependant, semblaient vivre de façon normale ou à peine modifiée.

Le remplacement des ions potassium par les ions sodium me paraissait chose bien étonnante puisque le potassium passe pour être un cation physiologiquement actif alors que le sodium semble uniquement intervenir en contribuant à maintenir la pression osmotique des milieux biologiques.

Etudier de plus près ces phénomènes qui se rattachent à celui encore si mystérieux de la perméabilité sélective des membranes aux ions, parfois à l'encontre des lois de la diffusion, m'a paru un sujet intéressant bien que sans doute difficile. Aussi ai-je été heureux que Monsieur le Doyen KAYSER veuille bien agréer le désir que j'exprimais de travailler sur ce sujet qui, au reste, se rapprochait de celui traité dans son laboratoire par mon camarade GERARDIN: le comportement des levures en présence d'ions mercuriques. De même que GERARDIN avait tâché d'étudier le mécanisme de l'adaptation au mercure, de même avons-nous également cherché à voir si la levure pouvait être adaptée au chlorure de

sodium et si cette levure adaptée présenterait des caractères nouveaux qui permettraient d'expliquer le mécanisme de l'adaptation.

Avant d'exposer notre travail expérimental, nous avons rédigé un chapitre introductif dans lequel nous rappelons les données classiques sur la perméabilité des membranes et où nous indiquons quelques théories modernes concernant le mécanisme du mouvement des ions au travers des membranes des levures.

Abordant ensuite la partie expérimentale, nous indiquons d'abord la nature du microorganisme dont nous nous sommes servi, les conditions de culture et le comportement de ce microorganisme lorsqu'il est placé dans des milieux nutritifs contenant du chlorure de sodium à diverses concentrations. Nous indiquons par quelle méthode nous adaptons *Candida utilis* à se développer sur un milieu hypersalé, formant ainsi une nouvelle souche dont l'adaptation se conserve même après culture dans un milieu dont la teneur en sels est normale.

Dans le chapitre II, nous comparons la respiration de nos deux souches de *Candida utilis* (la souche-mère et la souche adaptée que nous avons obtenue).

Dans le Chapitre III, nous indiquons comment nous avons effectué le dosage du sodium et du potassium contenus dans nos levures et les valeurs moyennes des teneurs de nos deux souches.

Leurs variations dans diverses conditions expérimentales sont rapportées dans le Chapitre IV: variations en fonction de l'âge des cultures, de la concentration en chlorure de sodium du milieu dans lequel elles sont cultivées ou conservées s'il s'agit d'un milieu non prolifé-

rant, de la durée du séjour dans ces milieux. Nous avons également cherché l'action éventuelle d'un changement de concentration de quelques constituants du milieu nutritif ou de l'addition de stéroïdes sur la teneur de la levure en sodium et en potassium.

Le dernier chapitre est consacré à la détermination de l'eau contenue dans les deux souches de *Candida utilis* précédemment étudiées; nous avons en effet été amené à penser que les mouvements d'ions que nous notions dans certaines circonstances étaient solidaires de mouvements des molécules d'eau provoqués par la trop forte tonicité du milieu extérieur.

o
o o

Je voudrais tout d'abord remercier ici ceux qui ont facilité ma tâche et m'ont permis de la réaliser.

Monsieur le Doyen KAYSER recommanda ma candidature à Monsieur le Directeur scientifique des Usines RHONE-POULENC. J'assure ici Monsieur le Professeur PAUL de ma profonde gratitude; je ne saurais assez le remercier de m'avoir fait compter dans le personnel de la Société RHONE-POULENC, ce qui m'a dégagé de tout souci matériel au long de l'élaboration de mon travail et me permet d'envisager l'avenir avec confiance.

Je remercie tout spécialement Monsieur le Doyen KAYSER qui inspira et dirigea mes recherches que sa haute compétence scientifique m'aida à mener à bien.

Je remercie également Monsieur le Professeur FRANQUET qui m'a fait l'honneur de bien vouloir accepter d'être juge de ma Thèse.

L'accueil bienveillant et les avis éclairés qui m'ont toujours été réservés par Mademoiselle BESSON, Professeur de Pharmacodynamie, appellent ma gratitude reconnaissante.

Mes remerciements vont en outre à Monsieur le Professeur BERNANOSE pour les conseils qu'il m'a prodigués.

J'ai plaisir à remercier aussi Monsieur MIRJOLET qui m'a fait profiter de son aide toujours judicieuse et qui m'a enseigné la manipulation du spectrophotomètre de flamme.

Je n'oublie pas non plus dans mes remerciements Messieurs PIERFITTE et VILLOUTREIX et Mademoiselle DAUCHY ainsi que tous mes camarades de laboratoire qui m'ont apporté leur expérience et leurs amicaux conseils.

- I N T R O D U C T I O N -

=====

RAPPEL DES NOTIONS CONCERNANT LA PERMEABILITE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES.
APPLICATION AUX MOUVEMENTS PROVOQUES DES IONS SODIUM ET POTASSIUM CHEZ
LES LEVURES.

Les biochimistes se sont aperçus depuis longtemps que les hématies humaines sont beaucoup plus riches en potassium et beaucoup plus pauvres en sodium que le plasma dans lequel elles baignent, ce qui prouve que les lois de la diffusion ne sont pas seules à régir la teneur des cellules en ions. Le fait que la répartition érythroplasmatisque du sodium et du potassium diffère dans beaucoup d'espèces voisines montre que, malgré le rôle physiologique souvent extrêmement important du potassium et l'absence probable de rôle spécifique du sodium, la distribution inégale et d'apparence paradoxale des ions potassium et sodium n'est sans doute pas nécessaire à la vie. Une grande partie de l'ion potassium jouerait un rôle osmotique semblable à celui que paraît jouer le sodium. Très peu de potassium suffirait sans doute à maintenir la vie; le potassium, dans certains cas, pourrait au point de vue physiologique se comporter comme un oligo-élément.

L'étude de tels problèmes n'a pas qu'un intérêt théorique; elle se rattache à l'ensemble des phénomènes encore mal expliqués du passage sélectif des aliments, voire des médicaments à travers les membranes cellulaires. Un aliment, un médicament, absorbés par voie orale doivent, avant d'être assimilés, franchir la membrane qui limite les cellules de la muqueuse intestinale, peut-être passer à travers plusieurs cellules, toutes limitées par des membranes, franchir un endothélium vasculaire, pour pénétrer dans le sang, franchir un autre endothélium pour quitter la circulation et enfin franchir la membrane de la cellule où ils seront utilisés.

Dans le cas où l'aliment et le médicament ne seraient pas intégralement transformés en gaz carbonique et eau, l'organisme devrait encore éliminer les déchets, ce qui ferait intervenir la perméabilité de la membrane du glomérule de Malpighi et celle des tubuli rénaux.

L'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose par exemple, l'action eutrophique des antibiotiques d'autre part, sont peut-être à rapporter à des modifications induites de la perméabilité des membranes biologiques.

La physiologie du nerf et celle du muscle semblent, en dernière analyse, être en rapport avec les mouvements des ions potassium et sodium au travers des membranes cellulaires.

Le développement des végétaux dans les terrains de composition fort variée suppose aussi une perméabilité sélective de la membrane des cellules de la racine pour permettre une absorption sélective ainsi qu'en témoigne, par exemple, la flore qui se développe au voisinage des marais salants.

La perméabilité sélective des membranes biologiques semble être un

phénomène inhérent à l'instauration de la vie, si l'on en croit l'opinion de CONWAY (1).

" Il est raisonnable de penser, écrit-il, que le développement de la cellule a eu lieu d'abord dans un milieu marin, qu'il s'est formé une membrane cellulaire et que, pour que la cellule conserve ses matériaux, cette membrane a dû être d'une perméabilité sélective. Il a fallu alors que la cellule invente un moyen de faire sortir activement l'ion chlore et l'ion sodium et il y aurait eu concentration des ions potassium. Les ions potassium sont devenus des activateurs enzymatiques ".

Par quel mécanisme cette perméabilité sélective peut-elle bien s'exercer?

Une hypothèse a été formulée depuis longtemps et vérifiée dans certains cas tout au moins, selon laquelle la membrane posséderait des lacunes, des pores qui joueraient le rôle de filtre, de tamis; ne peuvent passer à travers les mailles de ce tamis que les particules, molécules ou ions, dont le diamètre serait au plus égal à celui du pore.

Le passage de la particule à travers le pore dépendrait non seulement de son diamètre mais encore de la vitesse de circulation du liquide qui la contient (2). Cette manière de voir entre certainement en jeu dans le cas du passage de molécules et d'ions à travers l'endothélium capillaire et en particulier à travers l'endothélium du glomérule de Malpighi qui permet l'élaboration de l'ultrafiltrat rénal et qui laisse passer les ions et les molécules dont le diamètre est au plus égal à celui de la molécule de l'hémoglobine. Mais l'existence de pores n'a pas été reconnue dans toutes les membranes biologiques et d'ailleurs bien des phénomènes de perméabilité ont été observés dont

la théorie des pores ne permet pas de rendre compte. D'après les auteurs que cite GELLHORN, il semble que l'on ait voulu forcer les faits lorsque l'on prétendait expliquer la répartition inégale d'ions bien diffusibles tels que l'ion sodium et l'ion potassium parce que l'ion sodium hydraté est quatre fois plus gros que l'ion potassium (3)(4).

Cette théorie fut abandonnée lorsque LEVI (5) et USHING (6) toujours cités par GELLHORN purent montrer à l'aide du sodium radioactif que cet ion pénètre dans la cellule avec une vitesse du même ordre que celle de pénétration de l'ion potassium.

Ces expériences firent abandonner l'hypothèse qui tendait à expliquer l'inégale répartition des ions par l'inégalité de leur diamètre et LING (7), en 1952, lui substitue la notion d'affinité plus grande pour le potassium que pour le sodium présentée par certains complexes protéine-dérivés phosphorés, localisés dans les cellules; cependant CONWAY, en 1957, (8) critique la théorie de LING qui en particulier n'explique pas l'accumulation des ions potassium et chlore dans les cellules lorsque la concentration du milieu augmente.

Un tout autre mécanisme de transport des molécules et des ions d'un milieu extérieur à un milieu intracellulaire a pu être postulé et, bien qu'il ait été adopté par de nombreux chercheurs en raison de ce qu'il rend compte d'une manière relativement simple de beaucoup de phénomènes, il faut bien reconnaître qu'à l'heure actuelle, il n'y a pas d'observations cruciales qui imposent cette manière de voir. L'idée initiale semble être due à OSTERHOUT (9).

MACHEBOEUF (10) reprenant cette hypothèse pour son compte en 1948, l'exprimait de la manière suivante en l'appliquant à la pénétration des acides gras dans les cellules: Grâce à un enzyme qui

existerait à la surface extérieure de la membrane cellulaire, cet acide gras estérifierait facilement le cholestérol dont l'hydroxyle hydrophile se trouverait au voisinage de l'enzyme. L'ester ainsi formé ne jouit plus des propriétés tensioactives qui le maintiennent à la périphérie de la cellule, il est donc entraîné à l'intérieur de celle-ci. Une cholestérol estérase libère l'acide gras et le stérol, que ses propriétés tensioactives ramènent à la surface de la cellule.

En généralisant: une particule A du milieu extérieur se combinerait à un groupement tensioactif β d'une molécule B contenue dans la cellule grâce à la présence d'un enzyme périphérique. La molécule AB formée n'a pas de raison de rester à la surface de la cellule et migre vers l'intérieur où un enzyme E' la décompose, laissant A sur place alors que B, grâce à la tensioactivité de β , retourne à la périphérie pour reprendre son rôle de "transporteur" de la molécule A.

Cette hypothèse a été reprise par plusieurs auteurs et notamment par MITCHELL (II). Des enzymes spéciaux "translocases" existeraient dans la membrane cellulaire et agiraient sur les particules à transporter grâce à des liaisons de covalence, exactement comme le font les transphérases. Selon cette théorie, pour rendre compte de l'accumulation active du potassium dans les cellules (par accumulation active, on entend une accumulation qui se fait en sens inverse de celle que feraient présager les lois de la diffusion) et aussi pour rendre compte de l'accumulation possible du sodium si le potassium est absent du milieu nutritif, il suffit de postuler que le transporteur possède une affinité supérieure pour l'ion potassium que pour l'ion sodium. Pour CONWAY (I2) (I3), si l'on exprime par 100 l'affinité du transporteur pour l'ion potassium, cette affinité serait de 42

pour l'ion rubidium, de 7 pour l'ion caesium, de 4 pour l'ion sodium, de 0,5 pour les ions lithium et magnésium. Les mouvements des ions dépendent d'ailleurs des échanges d'énergie avec le milieu nutritif. Lorsque les cellules de levures sont mises en suspension dans l'eau, elles fermentent leurs propres réserves en expulsant le potassium cellulaire qui tombe à un niveau très bas. Si l'on donne à la cellule du glucose exogène à consommer, en même temps que des traces de potassium, ce potassium pénètre dans le milieu préférentiellement aux autres cations, comme si les anions formés dans le catabolisme glucidique étaient capables de capter les ions potassium. Pour CONWAY (I4), la cellule se comporterait donc comme une pompe à cations dont le fonctionnement serait en rapport avec les processus énergétiques, particulièrement avec la respiration. Le moteur de la pompe serait un transporteur d'hydrogène, ou un transporteur d'électrons, sans doute un cytochrome.

Cette même hypothèse de l'existence d'un transporteur d'ions a été mise en avant par JENNINGS (I5) pour rendre compte de la pénétration éventuelle des ions magnésium ou manganèse dans les cellules. Ce phénomène s'expliquerait par l'existence d'un transporteur dont la synthèse implique une phosphorylation enzymatique qui est en rapport avec l'absorption des ions phosphates.

C'est une hypothèse du même ordre que ROTHSTEIN, en 1954 (I6), en 1956 (I7), en 1958 (I8), développe encore lorsqu'il étudie la fixation des ions uranyle, manganèse et magnésium par la levure. Le rôle du transporteur pourrait incomber aux polymétaphosphates qui ont une affinité spéciale pour les métaux alcalins.

De tels mécanismes ont l'avantage d'expliquer le caractère li-

mité du transport qui n'augmente pas toujours avec la concentration et tend vers un maximum. Ils expliquent aussi la compétition entre ions; mais d'autres hypothèses demeurent possibles, par exemple la transformation enzymatique de la molécule ou de l'ion à transporter en un composé soluble dans les lipides de la membrane cellulaire (19).

Quoi qu'il en soit des hypothèses visant à expliquer le passage sélectif des molécules et des ions à travers les membranes biologiques, l'étude de la nature chimique de ces membranes possède un grand intérêt théorique et pourrait contribuer à l'élucidation des mécanismes de transport.

D'après ALBERT (20), cinq types de membranes naturelles pourraient être distingués:

1°) des membranes poreuses dont nous avons déjà parlé (p. 3), telles qu'en présentent les capillaires sanguins, par exemple.

2°) des membranes lipoprotéiques qui permettent l'entrée des molécules suivant le coefficient de partage huile-eau et qui nécessiteraient une dépense considérable d'énergie pour laisser les particules liposolubles sortir de la cellule.

3°) des membranes lipoprotéiques différentes des précédentes en ce qu'elles contiendraient des molécules à caractère anionique capables de contracter des combinaisons avec les cations et de permettre ainsi leur pénétration, indépendamment du degré de leur concentration dans le milieu extérieur.

4°) des membranes permettant le passage des anions contrairement au gradient de concentration en utilisant l'énergie formée par la combustion des aliments.

5°) Des membranes mixtes où plusieurs des mécanismes indiqués peuvent jouer simultanément.

L'étude de la membrane des microorganismes est très difficile et a montré, comme on pouvait s'en douter, qu'il existe de grandes différences de structure physique et chimique entre les diverses espèces.

Nous nous bornerons à indiquer ici les notions récentes acquises sur la structure de la membrane de *Saccharomyces cerevisiae*, ces données étant vraisemblablement transposables à *Candida utilis*, levure que nous avons employée dans notre travail.

La difficulté de ces études réside non seulement dans l'obtention de membranes intactes et privées de suc cellulaire, mais encore dans le fait que la levure cultivée sur bouillon peut être plus ou moins recouverte d'un matériel variable provenant du milieu de culture (21).

D'après NORTHCOTE, en 1952 (22), et KREGER, en 1954 (23), la membrane des levures serait formée de deux parties que l'on peut d'ailleurs distinguer au microscope électronique.

L'une contient des glucanes et mannanes (polyholosides dont l'hydrolyse donne respectivement du glucose et du mannose) qui lui communiquent une certaine rigidité et permettent de l'isoler en conservant sa structure.

L'autre membrane est formée également de mannanes, mais aussi de protéines et d'un peu de lipides, ces constituants pouvant être cénapsés et former une couche monomoléculaire de lipides liée à une couche monomoléculaire de protéides et à un complexe protéides-mannanes (24).

Les proportions respectives de ces différents constituants seraient 29 p.100 de glucanes, 31 p.100 de mannanes, 13 p.100 de protéines, 10 p.100 de lipides, peut-être un peu de chitine, 3 p.100 de cendres. Du glycogène serait associé à la membrane mais d'une façon labile qui ne résisterait pas au traitement physique nécessaire à l'obtention de cette membrane (25) (26).

La structure intime de la membrane est encore presque totalement inconnue; il est probable qu'elle varie d'une espèce à une autre, et même d'une race à une autre, rendant compte des phénomènes d'agglutination ou de localisation dans le moût (levure haute, levure basse) (27).

Cette membrane et les éléments qui lui sont étroitement associés formeraient sans doute ce que CONWAY (28) appelait "the thick cell wall".

CONWAY était arrivé à cette notion en comparant le volume de liquide qui sépare les cellules rassemblées par centrifugation et que l'on mesure à l'aide d'inuline , de gélatine, ou de peptone (environ 23 p.100 et le volume tel qu'il résulterait de l'emploi de l'arabinose, du galactose et du lactose (environ 33 p.100). La partie périphérique de la cellule contiendrait donc environ 10 p.100 d'eau; elle serait pénétrée facilement par de nombreuses substances, y compris les ions chlore., potassium, sodium .

Mais lorsque la cellule se trouve au repos ("resting-cells"), les ions ne peuvent quitter cette région externe et pénétrer plus avant dans le liquide cellulaire proprement dit. La pénétration dépend des phénomènes métaboliques.

Indiquons maintenant avec un peu plus de détails l'état actuel de nos connaissances concernant la pénétration du sodium et du potassium, l'échange de ces deux ions à travers les cellules, en particulier dans le cas des levures, puisque c'est ce sujet qui nous intéresse directement pour l'étude expérimentale que nous exposons dans les chapitres suivants:

CONWAY avait montré avec l'ammonium d'abord, avec le sodium ensuite qu'une levure de bière mise en suspension dans un milieu contenant des sels organiques de ces cations et du glucose, laisse pénétrer le cation en même temps qu'elle s'appauvrit en potassium. En pratiquant des fermentations successives, CONWAY (29) est arrivé à ce que 98 p.100 du potassium contenu initialement dans la levure ait disparu et que les ions sodium ou ammonium aient remplacé (d'une manière non stoechiométrique) le potassium. La présence d'une quantité même faible de potassium dans le liquide nutritif suffit à provoquer une pénétration préférentielle du potassium et le départ du sodium si celui-ci avait été accumulé préalablement.

En 1954, CONWAY (30) interprète ces résultats expérimentaux en admettant qu'il existe dans la levure des molécules agissant comme transporteurs, "carriers", de cations. Il y aurait deux transporteurs, l'un régirait l'absorption du potassium ou, si le potassium manque, l'absorption du sodium, à supposer que celui-ci soit abondant; l'autre transporteur serait impliqué dans le rejet du sodium intracellulaire vers l'extérieur.

Les deux transporteurs sont inhibés par l'anoxie ou par les cyanures. Le premier est en outre inhibé par l'action de l'azoture

de sodium et du dinitrophénol; le deuxième est inhibé par le froid ou par certains cations, tels que le mercure, l'or, l'argent, le palladium.

Ce travail de déplacement des cations serait alimenté par l'énergie libérée dans le transport d'électrons. C'est la "redox pump theory" (31).

Les transporteurs de cations seraient des enzymes respiratoires dans leur forme réduite. En 1958, résumant l'ensemble de ses travaux, CONWAY (32) émet l'hypothèse que ces transporteurs de cations seraient analogues ou identiques aux cytochromes mais localisés dans la membrane cellulaire de la levure.

Au cours de la fermentation, dans les conditions normales, il y a transport actif, c'est-à-dire transport même si la concentration du milieu est inférieure à la concentration intracellulaire. Dans ces conditions, le potassium pénètre dans la cellule et les ions hydrogène en sortent; le pH du milieu extérieur, si celui-ci est relativement peu abondant, peut même descendre jusqu'à 1,5. Au voisinage de la neutralité, le transporteur des ions potassium peut aussi transporter d'autres cations minéraux, si le potassium est absent du milieu et si leur concentration y est suffisante. La présence d'une petite quantité de potassium suffit à provoquer la pénétration préférentielle de celui-ci. L'emploi de potassium radioactif ou de métaux non physiologiques a permis à CONWAY (33) de doser le nombre de molécules de transporteur. Pour lui comme pour FOULKES (34), il y aurait 0,1 à 0,2 milliéquivalent de transporteur par kilogramme de levure.

FUHRMANN (35), en 1959, analysant ces phénomènes, pense que le

transporteur postulé devrait être soluble dans les lipides, se combiner aux cations, préférer le potassium au sodium.

La phosphatidylsérine et la sphingomyéline, bien que possédant ces propriétés, ne semblent cependant pas être les transporteurs physiologiques de cations.

Pour TOSTESON (36), l'accumulation de potassium et l'exclusion de sodium dans la plupart des cellules vivantes peuvent s'expliquer si on admet que le potassium est introduit par un transporteur organique et que le sodium intracellulaire peut quitter la cellule en empruntant un autre transporteur organique. Les essais sur les hématies de canard suggéreraient que ces transporteurs pourraient être des esters phosphoriques, peut-être un ester phosphorique d'adénosine. Pourtant, les nucléotides essayés n'ont pas présenté d'affinité plus marquée pour le potassium que pour le sodium.

Ainsi, pour certains auteurs, la levure pourrait se comparer à une résine échangeuse d'ions très sélective et qui aurait une prédilection marquée pour le potassium. Mais on n'a pas isolé jusqu'ici de substance cellulaire dont l'affinité pour le potassium soit prépondérante (37).

L'action si marquée de certains corticostéroïdes sur le métabolisme du sodium et du potassium a conduit à chercher si cette action se manifesterait aussi vis-à-vis d'autres cellules que celles du tissu rénal. C'est ainsi que CONWAY (38), dès 1953 sur la levure, montre que la cortisone et la 17-hydroxycorticostérone ont une action inhibitrice sur le transport actif du sodium et du potassium dans celle-ci

et que celle de la désœxycorticostérone est faible.

SCHATZMAN (39), en 1953, a montré que divers tonicardiaques inhibent les mouvements des ions à travers les hématies. GLYNN (40), en 1957, confirme et analyse ce phénomène. Pour cet auteur, la désœxycorticostérone et l'aldostérone sont sans action; seuls sont actifs les stéroïdes présentant un noyau lactone non saturé et une structure en 17 définie.

Ce rôle inhibiteur des stéroïdes pourrait laisser penser que le transporteur physiologique serait aussi un stéroïde dont les tonicardiaques inhibiteurs du mouvement des ions seraient en quelque sorte un facteur antagoniste (41).

Les doses de tonicardiaques employés peuvent être si faibles qu'il ne semble pas qu'il y ait par cellule plus de mille molécules de transporteur capable de fixer l'ion potassium, c'est-à-dire d'en favoriser la pénétration dans la cellule.

Pour SOLOMON (42) il y aurait douze mille de ces groupements transporteurs. Ce chiffre est encore si faible qu'il semble peu probable que l'on puisse parvenir à isoler d'une cellule un transporteur qui y serait aussi peu abondant.

La brève revue que nous venons de passer concernant le mécanisme du mouvement des ions à travers les membranes des cellules des levures en particulier, montre qu'à l'heure actuelle les causes des modifications de la composition ionique des microorganismes sont encore mal élucidées. Néanmoins, le rappel que nous avons fait des travaux effectués sur ces questions permet de mieux comprendre l'esprit dans lequel nous avons abordé notre travail expérimental dont nous allons maintenant faire l'exposé.

- C H A P I T R E I -

=====

ETUDE DE LA CROISSANCE DE CANDIDA UTILIS DANS DES
MILIEUX CONTENANT DES QUANTITES VARIABLES DE
CHLORURE DE SODIUM.

Dans ce chapitre, nous indiquerons d'abord la nature du micro-organisme utilisé dans nos recherches et les conditions de culture qui ont été choisies. Après un bref résumé des notions classiques sur l'adaptation des microorganismes aux poisons et en particulier sur l'adaptation des levures aux milieux à forte concentration en sels, nous indiquons comment nous avons pu réussir à obtenir une souche de Candida utilis qui se développe dans des conditions reproductibles, sur un milieu enrichi en chlorure de sodium.

A) Souche et milieu de culture :

Nous avons employé une levure blanche ne sporulant pas qui nous a été fournie par le "Centraal Bureau Vooer Schimmelculturs Yeast Division de Delft, Pays Bas". Il s'agit de Candida utilis (HENNEBERG) Nov. Comb. LODDER, (Torula utilis, HENNEBERG, 1926).

Nous avons utilisé un milieu de culture synthétique qui a déjà été employé au laboratoire et qui se prépare à partir de deux solu-

tions stock A et B, dont voici les formules:

1°) Solution A

Cl_2Ca	25	g
Cl_3Fe	0,05	g
Cl_2Mn , 4 OH_2	0,10	g
Eau distillée Q.S.p.	100	ml

2°) Solution B

So_4Mg , 7 OH_2	25	g
So_4Zn , 7 OH_2	0,10	g
Bo_3H_3	0,10	g
So_4Cu , 5 OH_2	0,01	g
IK	0,01	g
Eau distillée Q.S.p.	100	ml.

Pour obtenir un litre de milieu, nous mesurons successivement:

Thiamine (chlorhydrate)	0,4	mg
Riboflavine	0,2	mg
Acide nicotinique	5	mg
Acide paraminobenzoïque	0,03	mg
Pyridoxal	1	mg
d. pantothénate de calcium	0,5	mg
Mésoinositol	50	mg
Biotine	0,002	mg
Acide dl aspartique	100	mg
Sulfate d'adénine	20	mg
acide folique	0,002	mg
l-histidine monochlorhydrate	10	mg

dl tryptophanne	20	mg
dl méthionine	20	mg
ClNa	0,10	g
Saccharose	20	g
So ₄ (NH ₄) ₂	3	g
Po ₄ KH ₂	2	g
Solution A	1	ml
Solution B	1	ml
Eau distillée Q.S.p.	1000	ml

Le milieu est stérilisé à 110°C pendant vingt minutes à l'autoclave.

Quand nous désirions faire varier la composition du milieu nous ajoutions, avant la stérilisation, la quantité voulue du produit que nous voulions introduire (sels de sodium ou de potassium, acides aminés, excès de saccharose).

B) - Méthodes de culture

Nous utilisons une verrerie lavée au mélange sulfochromique, rincée soigneusement et stérilisée à l'autoclave. Nous pratiquons en général les cultures dans des fioles de 100 ml munies d'une tubulure latérale formée d'un tube à essai de 18 m/m de diamètre; ce dispositif permet de mesurer à volonté la densité optique de la culture sans risque de contamination .

Candida utilis doit être cultivée en aérobiose et, étant très sensible aux variations de température, celle-ci doit être maintenue constante. Nous avons fait construire (par les Etablissements Chaix

à Nancy) une cuve rectangulaire en cuivre dans laquelle circule de l'eau maintenue à 30° par un dispositif thermostatique et pourvue de 48 alvéoles. Chaque fiole est placée dans une alvéole et lestée par un anneau de plomb. Dans chaque fiole, l'agitation est réalisée par un barreau de téflon de 25 mm de longueur, mû d'un mouvement de rotation sur lui-même, grâce à un dispositif magnétique approprié.

Avant que nous ne possédions cet appareil, nous avons utilisé la cuve de l'appareil de WARBURG et son dispositif oscillant (fréquence de 60 par minute).

Lorsque nous avons besoin d'une quantité de levure plus grande que celle fournie par les fioles de 100 ml, nous employons des ballons de deux litres, que nous plaçons dans une cuve à température réglée à 30° et où l'aération est pratiquée en faisant passer un courant d'air filtré sur coton à l'aide d'une trompe à vide.

Nous suivons la croissance de la levure par néphénométrie à l'aide du spectrophotomètre "Coleman Junior" avec une lumière incidente d'une longueur d'onde de 610 μ .

Cette méthode de mesure du développement des microorganismes a été utilisée à leur satisfaction par nos prédécesseurs dans le Laboratoire de Chimie. On en trouvera une étude critique dans la thèse de POUCHOL (43).

Cependant, il peut arriver que sur milieu hypersalé les levures forment des amas et des chaînettes ce qui fausse les résultats de la méthode néphélométrique et la rendent inutilisable dans ce cas.

Nous avons exprimé des résultats en densité optique (cologarithme de la transmission) et nous avons, comme on le fait habituellement, multiplié par 100 la valeur lue de la densité optique.

Lorsque nous pratiquons les cultures dans les fioles de 100 ml, nous y plaçons 30 ml de milieu et nous ensemençons avec 0,5 ml d'une suspension de levure de densité optique 110-120. Lorsqu'il s'agit d'ensemencer une levure ayant poussé sur milieu hypersalé et dont le développement maximum est moindre que celui de la levure normale, nous employons 1 ml d'une suspension de densité optique 70.

Nous récoltons la levure par centrifugation; nous employons la centrifugeuse réfrigérée Jouan - type C 53.

Le culot de levure est remis en suspension dans de l'eau désionisée glacée. Après centrifugation et nouveau lavage à l'eau désionisée, une dernière centrifugation permet d'obtenir un culot de levure qui est dispersé avec soin dans de l'eau désionisée glacée, transvasé dans une fiole jaugée de volume voulu et complété à ce volume avec de l'eau désionisée.

C) - Généralités sur le comportement des microorganismes en présence de toxiques, en particulier sur le comportement des levures vis à vis de certains cations.

Lorsqu'un microorganisme est cultivé dans un milieu contenant une concentration plus forte qu'il ne peut tolérer d'une substance donnée, la prolifération cesse. Le microorganisme peut mourir (concentration bactéricide), ou, après un certain temps de latence, le développement du microorganisme peut se faire (bactériostase); on est alors amené à penser soit que l'ensemencement initial avait été fait à partir d'une population hétérogène qui contenait au moins un germe moins sensible au poison, soit que le poison est doué d'un pouvoir mutagène et qu'il a fait apparaître une cellule moins sensible à

l'action toxique, soit que le microorganisme a mis en jeu un nouvel enchaînement de réactions métaboliques qui lui permet de court-circuiter les effets du toxique.

Dans certains cas particuliers, on a pu induire la résistance en introduisant dans le milieu de culture des acides désoxyribonucléiques extraits de microorganismes/spontanément résistants ou rendus résistants par une méthode appropriée (43 bis).

Le plus souvent, l'accoutumance aux poisons est obtenue par la méthode des subcultures: le microorganisme est cultivé sur une concentration subtoxique de poison; après avoir été cultivé plusieurs fois sur cette même concentration, la croissance est devenue normale et la concentration en toxique est alors augmentée d'un certain pourcentage; de nouvelles cultures sont alors effectuées et lorsque la croissance est devenue satisfaisante, la concentration en toxique est à nouveau augmentée. Il arrive un moment où le maximum de tolérance est atteint, et où, malgré de nombreuses cultures successives le développement du microorganisme ne peut plus être amélioré.

D) - Tentative d'adaptation de Candida utilis à des concentrations accrues de chlorure de sodium.

Plusieurs auteurs se sont préoccupés de cultiver la levure en présence de quantités croissantes d'ions apportant ainsi une contribution à l'étude du phénomène d'acquisition de résistance des microorganismes. Cités par COOK (44), nous voyons qu'en 1954, PERLMAN et O'BRIEN, par exemple, réussissent à faire pousser normalement *Saccharomyces cerevisiae* en présence de 0,75 g p. 1000 de nitrate de cobalt

alors que la souche normale se développe mal en présence de 0,10 g de ce sel p. 1000 de milieu; en 1956, HARTELIUS montre que la résistance au chrome présentée par une levure peut être quadruplée par subcultures en présence de sels de chrome employés en concentration croissante; de nombreux travaux ont été réalisés avec le cuivre: Mac HARGUE adapte une souche de *Saccharomyces cerevisiae* à résister à une concentration de cuivre sept fois supérieure à celle que peut supporter la souche mère.

MINAGAWA obtient une levure qui tolère des concentrations relativement élevées de cuivre. Cet auteur affirme en outre avoir obtenu des extraits de souches adaptées qui, introduits dans les milieux de culture, permettent aux levures normales de se développer en présence de concentrations en cuivre qui, autrement, seraient toxiques pour elles.

NAIKI, MINAGAWA et Coll. (45) ont prouvé que des cellules résistant au cuivre accumulent une quantité de ce métal plus grande que celle fixée par les cellules sensibles (6,5 mg au lieu de 0,347 mg/g de levure sèche).

Divers auteurs ont réussi à obtenir des levures résistant au mercure. Notre prédécesseur au Laboratoire de Chimie, G. GERARDIN (45bis) utilisant la même souche que nous, réussit à cultiver *Candida utilis* sur chlorure mercurique à une concentration sept fois plus élevée que la concentration sur laquelle la souche mère peut croître à peu près normalement.

Nous nous sommes attaché à étudier la question de la toxicité des fortes concentrations en chlorure de sodium.

On sait en effet que les milieux de forte pression osmotique sont défavorables à la prolifération de certains microorganismes et c'est pourquoi les aliments sont parfois conservés dans des saumures ou en présence de forte quantité de saccharose. Il est pourtant d'observation courante que des moisissures peuvent se développer sur des pots de confitures montrant que certains microorganismes peuvent résister à de très fortes pressions osmotiques.

TAKADA (46), par le procédé des subcultures, entraîne ses levures à proliférer sur de fortes concentrations salines soit en chlorure de sodium, soit en chlorure de potassium, et il conclut que les cellules entraînées aux fortes concentrations en chlorure de sodium ou en chlorure de potassium sont adaptées à tous les milieux de forte pression osmotique quelle que soit la substance qui produit cette forte pression et qu'en outre la cellule adaptée au chlorure de sodium ou au chlorure de potassium l'est spécifiquement à ces sels. Il y aurait une double adaptation: adaptation à un métal et adaptation à la pression osmotique. Les cellules de levure peuvent encore proliférer si on les transporte de leur milieu normal de culture à un milieu contenant du chlorure de sodium ($4M/l$); les cellules des plantes supérieures au contraire sont plasmolysées et généralement tuées lorsqu'elles sont soumises à un brusque changement de pression osmotique (47).

Nous avons eu l'occasion de montrer cependant que le facteur temps intervient dans l'action toxique des fortes concentrations en sels: *Candida utilis*, placée pendant 2 h dans une solution de chlorure de sodium ($3M/l$), reste vivante; mais au bout de 4 h, il semble

que les possibilités de défense de la cellule contre la forte pression osmotique du milieu soient débordées puisqu'il ne subsiste que 2 p.100 de cellules vivantes, c'est-à-dire capables de proliférer à nouveau lorsqu'on les ensemence sur un milieu de culture normal.

Pour réaliser notre essai d'adaptation (voir tableau n° I et graphiques n° I et 2), nous sommes partis de la levure normale cultivée à plusieurs reprises sur notre milieu normal. Elles présentent alors un faible temps de latence apparente, c'est-à-dire que la croissance devient apparente au spectrophotomètre au bout de deux à trois heures; le maximum de densité optique, 120-130, est atteint en quinze heures environ.

Nous avons ensemencé 0,5 ml de suspension de levure dans 30 ml de milieu progressivement plus concentré en chlorure de sodium. Ainsi, nous avons ensemencé tout d'abord la levure normale sur une demi-douzaine de fioles contenant un milieu à 150 m.eq./l de sodium, sous forme de chlorure. A partir de la fiole qui nous a donné la densité optique maximale, nous avons pratiqué un nouvel ensemencement sur le même milieu à 150 m.eq./l de sodium. Au troisième passage, la fiole qui a eu le développement le meilleur est ensemencée sur un milieu contenant 300 m.eq./l de sodium. La croissance étant toujours correcte, nous sommes passé successivement à des teneurs de 400, 500 m.eq./l de sodium. Pour 600 m.eq./l de sodium, la densité optique n'atteint plus que 89 au bout de 20 h et ne dépasse pas cette valeur même en répétant les cultures.

Puis, au fur et à mesure que nous avons augmenté la pression osmotique du milieu, la densité optique finale n'atteignait plus que:

- Tableau n° I -

Densité optique (x 100 - D 0 initiale) de cultures de Candida utilis en cours d'adaptation sur des milieux enrichis en chlorure de sodium.

Temps de culture en heures	Souches N	N/I000	600	700	800	900	I000	II00	I500
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0								
2	0						0		
3	I								
4	2								
5							I		
6	I3						3		
7	2I						4		
8	33	3					6		
9	45						I0		
I0	59								
II	72								
I2	4								
I3									
I4		7	68	52	38	33		I3	
I5	I23		73	58	44	38			3
I6	I0	I0	79	65	50	43		I4	4
I7		I2	83	7I	56	48			
I8			87	77	62	52		I8	
I9		I7	88	79	67	58		2I	
20		89	89	83	72	63		25	
2I			89	86	75	66			
22								28	
23							69	32	
24	I37							34	
48		67							4
2I6									2I
278									45
302									50
325									53

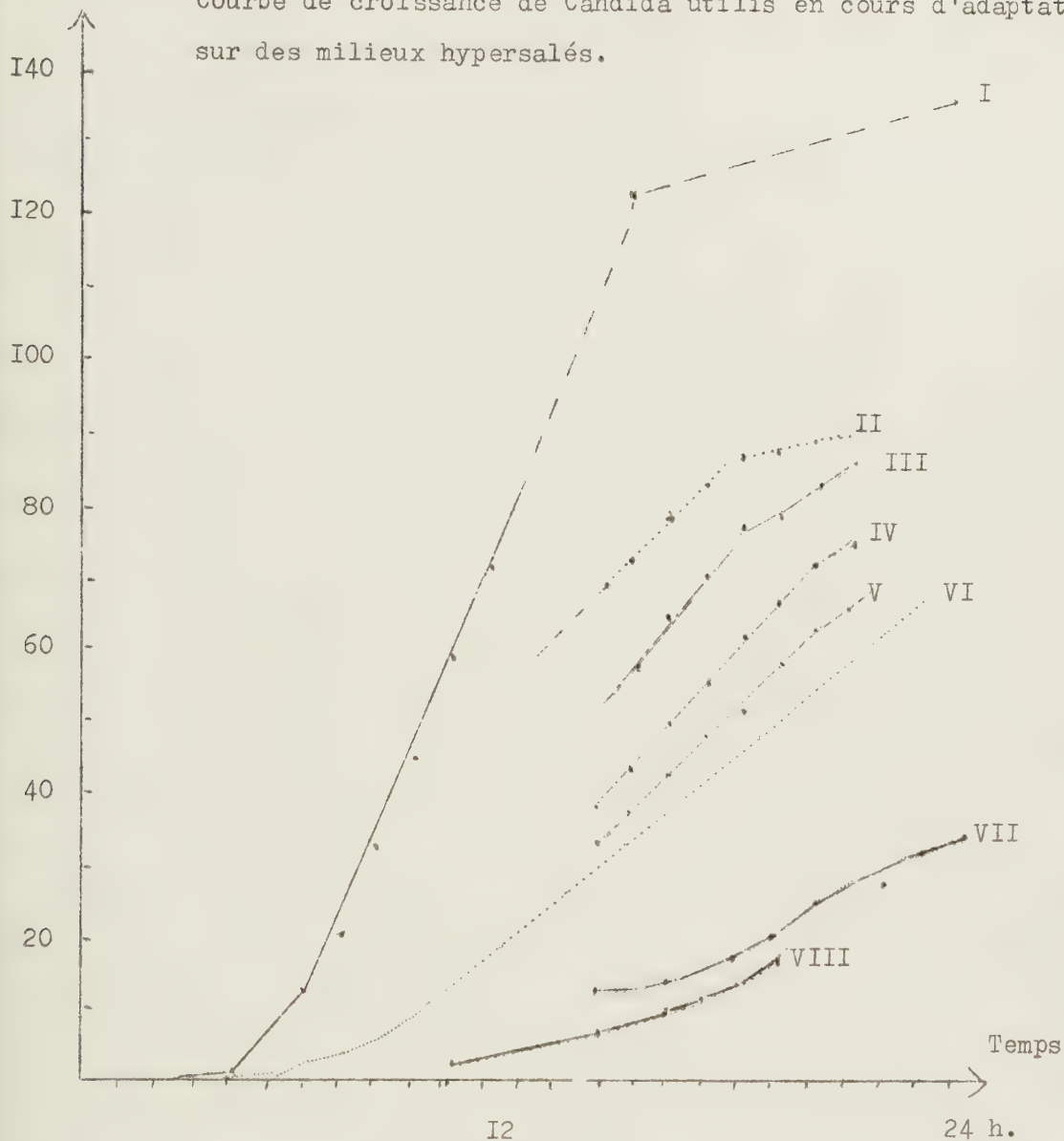
N = souche normale cultivée sur milieu normal.

N/I000 = souche normale ensemencée directement sur un milieu contenant du chlorure de sodium (IM/l), sans entraînement progressif.

- GRAPHIQUE N° I -

Densité optique
(x 100)

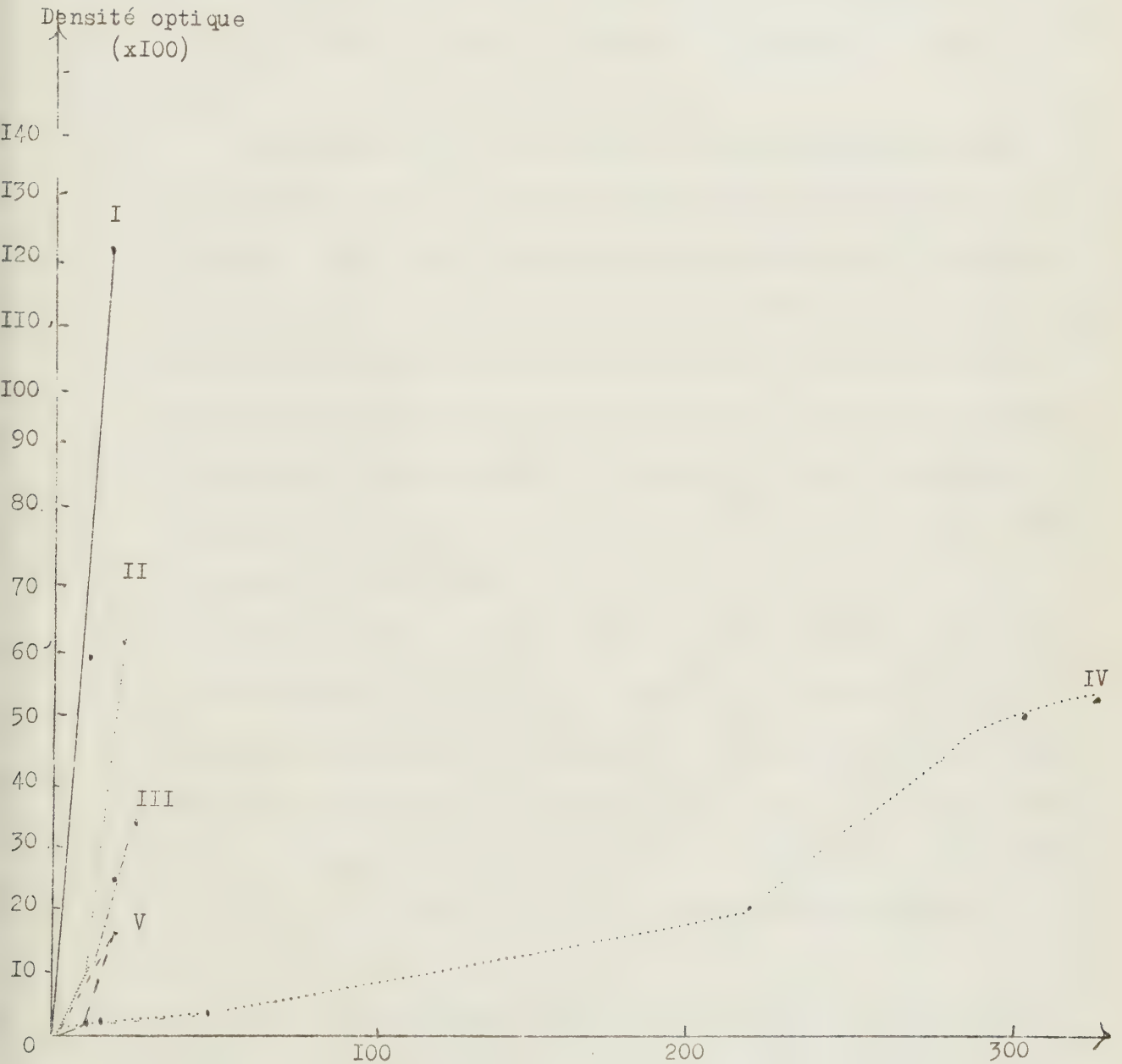
Courbe de croissance de *Candida utilis* en cours d'adaptation
sur des milieux hypersalés.



- I - - - - - Levure normale cultivée sur milieu normal
- II Levure progressivement entraînée à croître sur des milieux hypersalés : milieu à 600 m.eq./l de sodium.
- III Levure progressivement entraînée cultivée sur milieu à 700 m.eq./l. de sodium.
- IV Levure progressivement entraînée cultivée sur milieu à 800 m.eq./l. de sodium.
- V Levure progressivement entraînée cultivée sur milieu à 900 m.eq./l. de sodium.
- VI Levure progressivement entraînée cultivée sur milieu à 1000 m.eq./l. de sodium.
- VII Levure progressivement entraînée cultivée sur milieu à 1100 m.eq./l de sodium.
- VIII Levure normale cultivée directement sur milieu à 1000 m.eq./l. de sodium.

- G R A P H I Q U E N° 2 -

Courbe de croissance de *Candida utilis* en cours d'adaptation
sur des milieux hypersalés.



- I _____ Levure normale cultivée sur milieu normal
II Levure progressivement entraînée sur milieu à 1000 m.eq./l de sodium
III - - - - - Levure progressivement entraînée sur milieu à 1100 m.eq./l de sodium
IV _____ Levure progressivement entraînée sur milieu à 1500 m.eq./l de sodium
V Levure normale cultivée directement sur milieu à 1000 m.eq./l. de sodium.

86-75-66-70-34 au bout de 24 h de culture dans des milieux contenant: 0,7-0,8-0,9-I,0-I,1 M/l de chlorure de sodium.

Dans un milieu à 1,5 M/l de chlorure de sodium la phase de latence apparente atteint 48 h et la croissance est extrêmement lente puisque la densité optique n'atteint 53 qu'au bout de 325 h de culture.

Ces expériences mettent nettement en évidence que, à chaque concentration du milieu en chlorure de sodium correspond un mode de croissance défini par la durée de la phase apparente de latence, par la valeur du maximum de densité optique atteinte par le temps au bout duquel ce maximum est atteint. Ces paramètres, une fois acquis, ne peuvent plus être modifiés par subcultures. C'est ainsi que les caractères de la souche adaptée à proliférer sur milieu contenant 1M/l de chlorure de sodium n'ont pas été modifiés après trois cents repiquages sur le même milieu.

Naturellement, la levure normale placée d'emblée sur un milieu riche en chlorure de sodium, se comporte différemment de la souche dite adaptée que nous avons obtenue. Le tableau n° I montre par exemple que la levure normaleensemencée sur milieu (1 M ClNa) n'a proliféré que de façon très faible (D.O.= 10) alors que la levure normale sur milieu normal a atteint son développement maximum (D.O.=123) au bout de 15 h.

Cette levure normale cultivée sur le milieu (1 M ClNa) n'atteindra la densité optique maxima de 67 qu'au bout de quarante huit heures.

Ainsi, la levure que nous avons cultivée sur milieu hypersalé diffère nettement de la levure normale: elle prolifère plus rapidement

et davantage lorsque la teneur en chlorure de sodium est élevée et ceci est toujours vrai même après lui avoir fait subir 8 à 10 passages successifs sur le milieu normal. Par contre, on ne peut pas dire qu'elle soit parfaitement adaptée au milieu hypersalé puisque sa croissance est plus lente et moins complète que celle présentée par la levure normale cultivée sur milieu normal.

Il semble bien que nous soyons dans le cas de l'acquisition progressive d'une adaptation relative aux fortes concentrations salines jouant le rôle de toxique. La manière dont cette adaptation a été obtenue, et que nous avons rapportée, en est déjà un gage. Pour contrôler si l'adaptation que nous avons obtenue était reproductible, nous avons renouvelé les mêmes expériences. Cette deuxième série d'expériences s'est déroulée exactement comme la première: l'adaptation a été progressive et n'a pu être complète; dans les deux séries d'expériences, la vitesse et le maximum de croissance atteint sur milieux enrichis en chlorure de sodium ont été du même ordre.

L'adaptation obtenue n'étant pas parfaite, nous avons cherché à l'améliorer en modifiant la composition du milieu de culture. C'est ainsi que nous avons décuplé la concentration du milieu en méthionine ou en tryptophane, acides aminés indispensables à la levure; le comportement de la levure en milieu hypersalé (1 M ClNa) n'en a pas été modifié. Nous avons pensé aussi que la dépense énergétique de la levure pour proliférer en milieu hypersalé était peut-être augmentée et nous avons enrichi le milieu en saccharose; la concentration normale (2 p.100) a été portée à 4,6,8,10 p.100 dans différents essais sans que la densité optique obtenue au bout de 24 h de culture dans

ces milieux à la fois fortement salés et fortement sucrés s'en trouve modifiée.

o
o o

Ainsi, par la méthode des subcultures sur milieux progressivement enrichis en chlorure de sodium, nous avons obtenu des souches de levure qui peuvent se développer plus rapidement et davantage sur milieu hypersalé que ne le fait la levure mère; le taux de croissance et le maximum atteint sont stables et ils sont toujours inférieurs à ceux que présente la levure-mère cultivée sur milieu normal; les modifications de composition du milieu de culture que nous avons essayées n'ont pas modifié ces paramètres. La levure adaptée, cultivée sur milieu normal, conserve ses caractères d'adaptation au milieu hypersalé.

Nous avons choisi d'effectuer nos expériences ultérieures sur le milieu à 1000 m.eq./l.

- C H A P I T R E I I -

=====

COMPARAISON DES RESPIRATIONS DE CANDIDA UTILIS,
SOUCHE-MERE ET SOUCHE ADAPTEE A SE DEVELOPPER EN PRESENCE
D'UNE CONCENTRATION MOLECULAIRE DE CHLORURE DE SODIUM

Nous avons indiqué au chapitre précédent que nous avons pu obtenir, à partir de notre souche de Candida utilis, une nouvelle souche de microorganismes qui étaient capables de se développer sur des milieux enrichis en chlorure de sodium. Nous nous sommes aussitôt posé la question de savoir si cette adaptation au chlorure de sodium avait entraîné d'autres modifications de Candida utilis. L'intensité de la respiration est aisément mesurable chez les microorganismes; elle traduit la résultante de nombreux processus métaboliques et représente une valeur particulièrement sensible dans le cas de Candida utilis qui ne se développe qu'en aérobiose.

Dans ce chapitre, nous donnons nos résultats expérimentaux concernant la respiration comparée de notre souche-mère et de la souche obtenue par adaptation à proliférer sur milieu enrichi en chlorure de sodium (IM/1); nos comparaisons sont faites par étude de la respiration de la levure en milieu non proliférant, non salé et dans le

même milieu additionné de chlorure de sodium de façon à réaliser une concentration moléculaire de ce sel. Nous pensions en effet que la levure adaptée peut réagir, respirer autrement que la levure normale lorsqu'elle est placée dans le milieu hypersalé auquel elle a été adaptée.

A) - Principe de la méthode :

Une culture de levures est mise en suspension dans un milieu non proliférant c'est-à-dire dans un milieu salin d'où toute source azotée est exclue mais qui contient du glucose à la concentration de 1 p.100.

B) - Technique.

Nous utilisons la méthode indiquée par WARBURG et employons l'appareil décrit primitivement par cet auteur et perfectionné par la suite. (Appareil de WARBURG modèle S.65 fabriqué par B.BRAUN à Melsungen, Allemagne). Nos levures sont cultivées sur leur milieu respectif et nous les récoltons au début de leur phase de croissance logarithmique, lorsque la densité optique de la culture est comprise entre 30 et 50. Nous centrifugeons et lavons le culot avec une solution de phosphate monopotassique M/15. Nous mettons les levures lavées dans cette même solution. La prise d'essai est choisie de telle façon qu'elle corresponde à un poids sec de 0,5 à 2 mg par manomètre, suivant les indications données par WARBURG. Nous effectuons les mesures manométriques selon la méthode classique que nous n'exposerons pas ici, nous contentant de spécifier quelques points de détail.

Les mesures et l'ensemble de l'opération se font à une température uniforme de 30°C. Dans chaque fiole manométrique, nous introduisons

successivement:

- 2 ml de suspension de levure dans une solution de phosphate monopotassique M/15 à pH 4,6 correspondant à un poids de levure sèche compris entre 0,5 et 2 milligrammes.
- 1 ml d'une solution de glucose à 3 p.100 placée dans le diverticule latéral.
- 0,3 ml d'une solution de potasse à 40 p.100 placée dans le compartiment central.

La durée de chaque expérience est de quatre heures pour la respiration en présence de glucose. Lorsque nous voulons étudier aussi la respiration endogène, l'opération dure sept heures: trois heures avant l'introduction du glucose, puis quatre heures après introduction de la solution de glucose qui avait été placée dans le diverticule latéral de l'appareil. La respiration de la levure peut varier notablement d'un échantillon à l'autre d'une même souche malgré les précautions prises de sorte qu'il est toujours nécessaire d'opérer simultanément sur plusieurs fioles et de prendre la moyenne des résultats. On peut ainsi construire une courbe donnant la consommation d'oxygène en fonction du temps et calculer le coefficient respiratoire de chaque échantillon, Q_{O_2} (ce coefficient étant la quantité de Δl d'oxygène consommé par mg de matière sèche et par heure.)

C) - Résultats .

Les Q_{O_2} que nous avons mentionnés dans ce paragraphe représentent une moyenne de résultats obtenus avec plusieurs manomètres pour une même souche comme cela est pratiqué couramment. Chaque Q_{O_2} représente donc le résultat d'une expérience faite en plusieurs exem-

plaires. Nous avons tracé dans des graphiques les courbes représentant la consommation d'oxygène en fonction du temps de certaines de nos souches dont nous indiquons le Q_{O_2} dans les pages qui suivent; nous n'avons pas fait figurer les courbes de consommation d'oxygène de toutes les souches étudiées mais nous avons pu constater qu'elles étaient toujours des droites.

Nous avons effectué deux groupes d'essais et nous donnons ici comme exemple l'essai que nous retrouverons ultérieurement au paragraphe c) : *Candida utilis* (souche-mère) a été cultivée pendant 24 h dans le milieu normal; nous avons mis en suspension une partie de la culture dans le tampon normal de WARBURG et l'autre partie dans le tampon de WARBURG enrichi en chlorure de sodium (IM/1). Nous avons indiqué dans le tableau n° I bis la consommation d'oxygène par mg de levure sèche en fonction du temps ainsi que le quotient respiratoire calculé. Nous avons donc fait des essais dans les conditions comparatives suivantes:

a) en solution non enrichie en chlorure de sodium:

I°) emploi de la levure normale cultivée sur milieu normal:

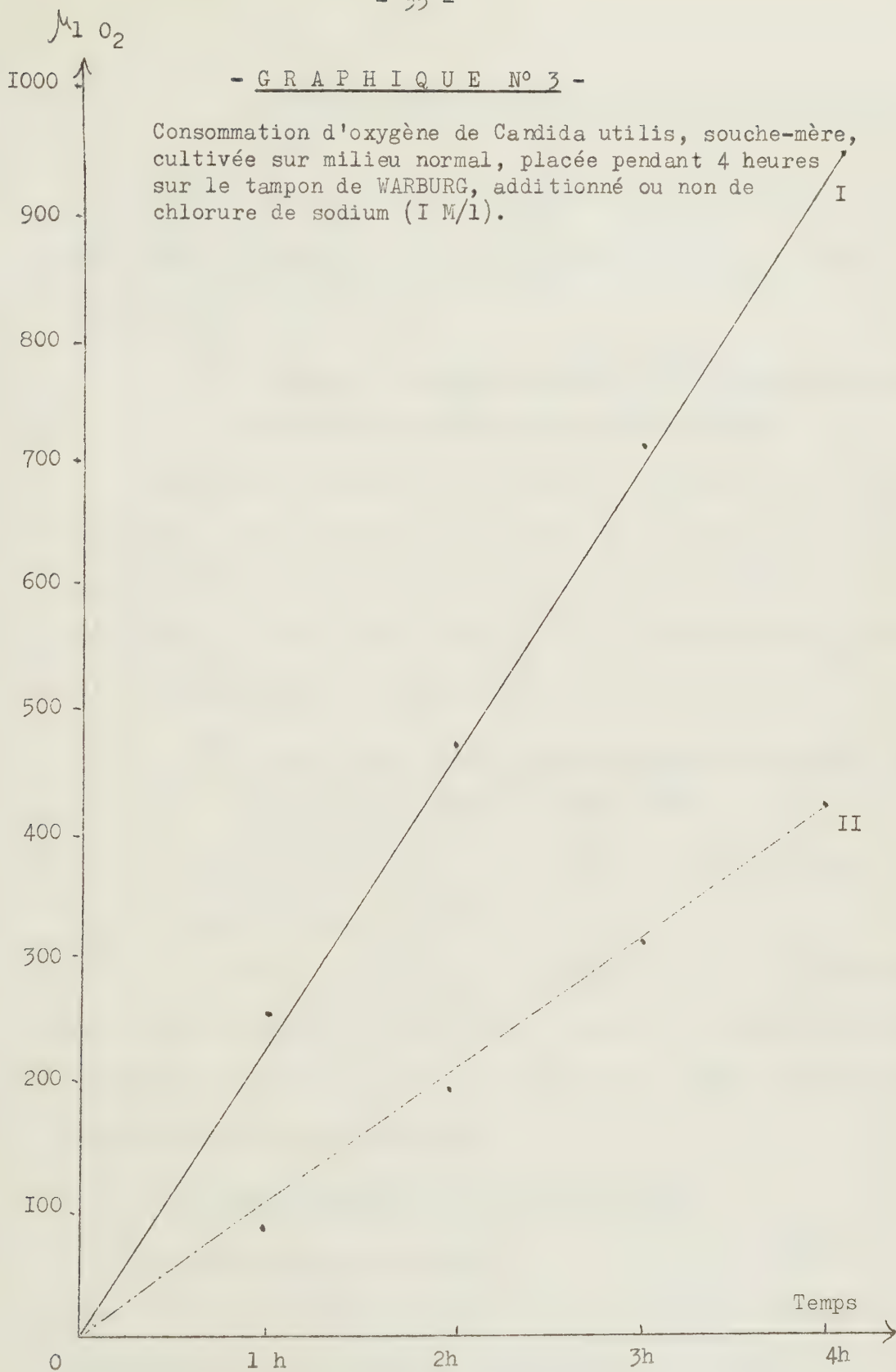
Nous avons fait cinq opérations différentes avec des levures provenant de cultures différentes et nous avons trouvé les Q_{O_2} suivants: 117-183-232-267-269; donc un Q_{O_2} moyen de 213,6. Nous avons indiqué au graphique n° 3 la courbe de consommation d'oxygène en fonction du temps de la souche qui a un Q_{O_2} de 232.

Ces valeurs sont très divergentes et montrent que pour pouvoir affirmer qu'une levure se comporte de façon différente de la levure normale, il faut que sa consommation d'oxygène soit franchement très différente des chiffres notés ici.

- Tableau n° I bis-

Consommation d'oxygène de *Candida utilis* (souche mère) en microlitres par milligramme de matière sèche et par heure en milieu tampon de WARBURG hypersalé ou non.

Durée de l'expérience en heures	Tampon normal sans addition de ClNa	Tampon normal avec addition de ClNa (1 M/l)
I	268	96
2	482	198
3	728	320
4	929	434
Qo ₂	232	108



I ——— Tampon de WARBURG normal, $QO_2 = 232$
 II - - - - - Tampon de WARBURG additionné de chlorure de sodium (1 M/l)
 $QO_2 = 108$.

2°) emploi de la levure adaptée, mais cultivée sur milieu normal:

L'expérience que nous avons réalisée nous a donné un Q_{O_2} de 213, valeur identique à celle obtenue avec la levure normale cultivée sur milieu normal.

3°) emploi de la levure adaptée, cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (IM/l):

Nous avons obtenu les Q_{O_2} suivants: 91 et 155 au cours des deux essais que nous avons réalisés; ce sont des chiffres très faibles, mais il faut noter que le chiffre minimum pour la levure normale cultivée sur milieu normal a été de 117; les chiffres que nous avons notés ici sont donc à la limite inférieure de la normale.

4°) emploi de la levure normale cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (IM/l):

Nous avons trouvé un Q_{O_2} de 156, valeur qui se trouve donc aussi à la limite inférieure de la normale.

De ce premier groupe d'essais, il résulte que les respirations de la levure normale et de la levure adaptée sont analogues, elles paraissent être l'une et l'autre un peu plus faibles pour des levures provenant de milieux hypersalés.

b) en solution enrichie en chlorure de sodium:

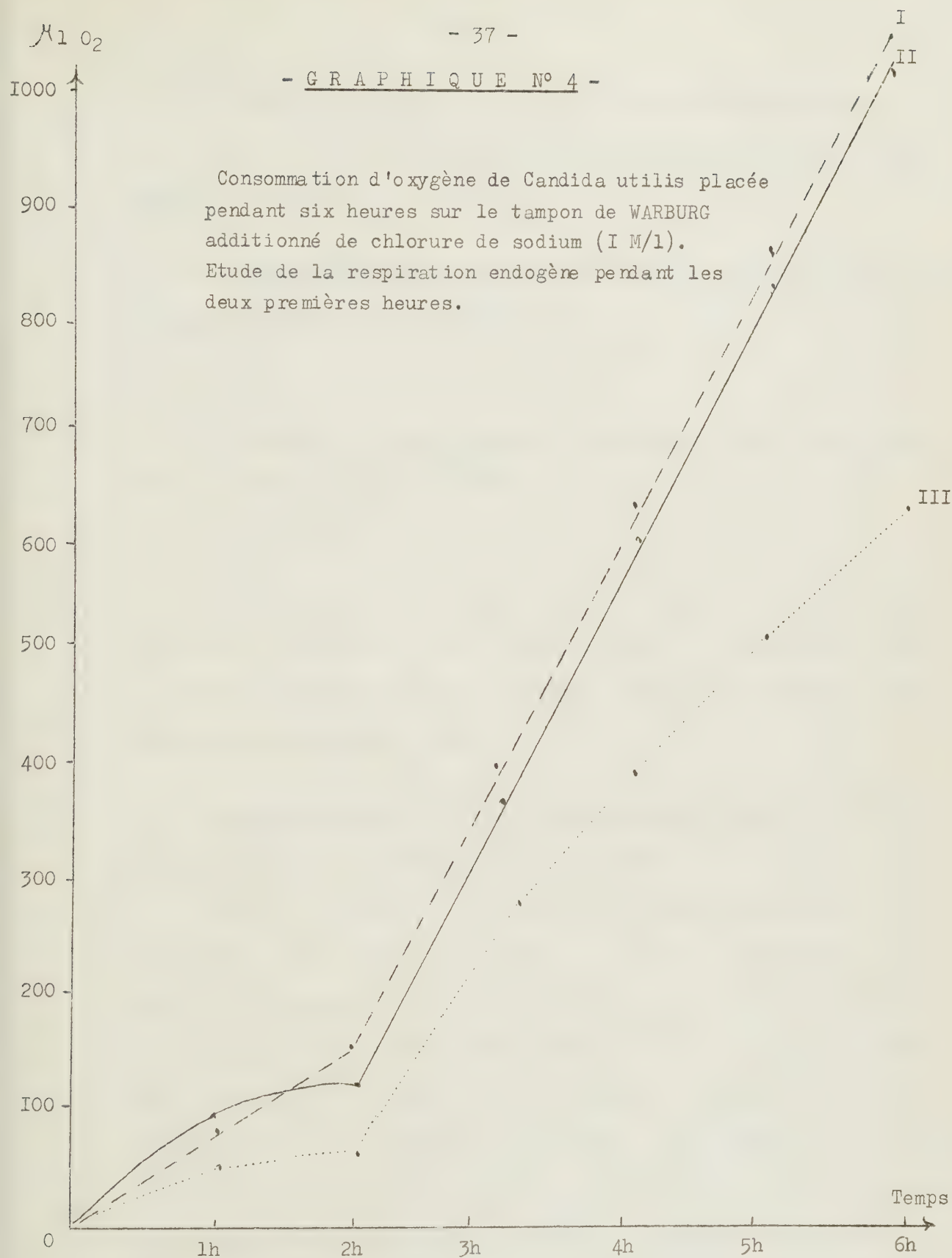
Le liquide tampon de WARBURG a été additionné de chlorure de sodium de façon à avoir une concentration moléculaire. (Voir dans le graphique n° 4 les courbes qui schématisent la consommation d'oxygène en fonction du temps de Candida utilis placée dans les différentes conditions que nous mentionnons ci-dessous).

$Ml O_2$

- 37 -

- GRAPHIQUE N° 4 -

Consommation d'oxygène de *Candida utilis* placée pendant six heures sur le tampon de WARBURG additionné de chlorure de sodium (1 M/l).
Etude de la respiration endogène pendant les deux premières heures.



- I - - - - - Levure adaptée cultivée sur milieu à 1000 m.eq./l de sodium
 II ———— Levure normale cultivée sur milieu à 1000 m.eq./l de sodium
 III Levure normale cultivée sur milieu normal.

1°) Emploi de la levure normale cultivée sur milieu normal.

Au cours des deux essais que nous avons réalisés, nous avons obtenu les Q_{O_2} suivants: 108 et 123.

2°) Emploi de la levure adaptée cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1M/l).

Nous avons obtenu un Q_{O_2} de 239.

3°) Emploi de la levure normale cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1M/l):

Nous avons obtenu un Q_{O_2} de 240.

Il résulte donc de ce deuxième groupe d'expériences que la respiration de *Candida utilis* est semblable pour la souche-mère et pour la souche adaptée à condition que toutes deux aient été cultivées au préalable dans un milieu hypersalé.

c) Comparaison des effets des solutions enrichies ou non en chlorure de sodium sur une même culture de levure:

Nous avons voulu voir l'influence des milieux hypersalés sur la respiration d'une même souche. Nous avons donc procédé de la manière suivante: nous avons divisé en deux le culot obtenu par centrifugation d'une culture de notre souche-mère cultivée sur milieu normal; nous avons mis en suspension dans le liquide de WARBURG normal une partie de ce culot et l'autre partie dans ce même liquide enrichi en chlorure de sodium. Les Q_{O_2} ont été respectivement: 232 et 108. Nous avons indiqué dans le graphique n° 3 les courbes de consommation d'oxygène en fonction du temps.

La souche utilisée étant la même, ces deux valeurs peuvent va-

lablement être comparées et nous pouvons en conclure que la présence d'une forte concentration en chlorure de sodium diminue très nettement la respiration de la levure.

d) respiration endogène:

Nous avons voulu aussi nous rendre compte s'il y avait une différence entre les respirations endogènes des différentes souches placées en suspension dans les solutions employées en a et b.

1°) Respiration endogène de levures placées en suspension dans la solution a:

Nous avons étudié pendant trois heures la respiration endogène de la souche-mère cultivée sur le milieu normal et de la souche adaptée cultivée sur le milieu normal.

La moyenne du volume d'oxygène consommé par heure et par milligramme de levure sèche au cours des trois heures d'expérience est légèrement plus élevée pour la souche-mère que pour la souche adaptée: 34,3 μ l d'oxygène dans le premier cas, 29,7 μ l dans le deuxième.

2°) Respiration endogène des levures placées en suspension dans la solution b :

Nous avons étudié la respiration endogène pendant deux heures: de la souche-mère cultivée pendant 24 h sur milieu normal, de la souche-mère cultivée pendant 48 h sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (IM/l), de la souche adaptée cultivée pendant 24 h sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (IM/l). Les respirations endogènes des souches-mère et adaptée cultivées sur le milieu hypersalé sont assez semblables, plus élevées pourtant dans le cas de la souche-mère: 82,5 μ l d'oxygène par heure et par milligramme de

levure sèche contre 65,41 dans le cas de la souche adaptée.

Par contre, la respiration endogène de la souche-mère cultivée sur milieu normal est nettement plus faible: 42,541 d'oxygène par heure et par milligramme de levure sèche. Les courbes traduisant la respiration endogène se trouvent au graphique N° 4.

o
o o

La respiration de *Candida utilis* issue de notre souche-mère et cultivée sur milieu normal ne diffère pas notablement de la respiration de la levure qui a été préalablement adaptée à se développer sur de fortes concentrations en chlorure de sodium. Il n'y aurait donc pas de différence nette entre les métabolismes de ces deux souches, mais la présence d'une forte concentration en chlorure de sodium dans le milieu de culture diminue le métabolisme de la levure d'une manière appréciable, ce que l'on peut rapprocher du ralentissement de la croissance que causent les milieux hypersalés, ainsi que nous l'avons rapporté au chapitre précédent.

- C H A P I T R E I I I -

=====

TENEUR EN SODIUM ET EN POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS, SOUCHE-MERE
ET SOUCHE ADAPTEE A PROLIFERER EN PRESENCE DE FORTES CONCENTRATIONS
EN CHLORURE DE SODIUM.

Dans cette partie de notre travail, nous avons indiqué la technique que nous avons employée pour doser les ions sodium et potassium contenus dans la levure et les résultats expérimentaux obtenus dans différentes conditions de concentration en sels.

A) - Technique de dosage.

Nous récoltons la levure à densité optique maximale par centrifugation de cinq minutes à 5000 tours par minute, à basse température, dans un centrifugeur réfrigéré Jouan, type C 53 . Puis nous lavons deux fois à l'eau désionisée glacée et mettons en suspension dans un volume connu d'eau désionisée. CONWAY, RYAN, CARTON (48) 1954, pratiquaient aussi deux lavages, mais avec l'eau du robinet, estimant qu'il n'y avait pas de diffusion importante d'ions pendant un court laps de temps; par la suite CONWAY et DUGGAN (49) 1958, ont cependant

préférré employer l'eau désionisée pour les lavages.

Aux dosages chimiques toujours longs et nécessitant des prises d'essai relativement importantes, nous avons préférré les dosages par photométrie de flamme, méthode sensible, qui se prête bien aux dosages en série. Les dosages par photométrie de flamme sont relatifs et nécessitent des solutions étalons. Pour obtenir les solutions indispensables, nous avons dissous dans de l'eau rigoureusement désionisée du chlorure de sodium ou du chlorure de potassium. "R.P. purs pour analyse" préalablement desséchés pendant une heure à l'étuve à 105° C. Les solutions stock contenant 10 m.eq./l permettent d'obtenir des dilutions constituant une gamme contenant: 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 - 0,50 - 0,60 - 0,70 - 0,80 - 0,90 - 1 milliéquivalent de sodium ou de potassium par litre. Au photomètre de flamme, cette gamme permet de tracer une courbe.

Les solutions étalons sont conservées dans des flacons en polyéthylène fermant hermétiquement, le verre Pyrex cédant toujours un peu de sodium aux solutions qu'on y conserve longtemps. Nous contrôlons souvent les étalons en dosant une solution de titre connu, préparée extemporanément.

Nous pratiquons les dosages selon la méthode courante, en deux temps.

Dans un premier temps, on détermine par tâtonnements entre quelles valeurs de l'étalon se trouve compris l'échantillon que l'on dose. Dans un deuxième temps, on s'efforce d'enserrer l'échantillon entre les deux échantillons dont les concentrations sont immédiatement inférieure et supérieure. Le résultat est fourni par la méthode graphique: les deux points représentatifs des valeurs de l'étalon sont

joints par une droite qui permet de déterminer la valeur exacte de l'échantillon que l'on dose; en effet, si les deux points sont assez proches, on peut considérer la portion de courbe ainsi définie comme étant une droite.

Si l'on pratique des dosages en série, les teneurs des différents échantillons risquent d'être notablement éloignées les unes des autres; il faudra donc faire des mesures avec plusieurs solutions étalons dont les points représentatifs ne formeront une droite que si les concentrations des étalons extrêmes sont assez rapprochées; même si la courbe représentative n'est pas rectiligne, elle peut être employée pour en déduire les teneurs en sodium ou en potassium des solutions examinées. A titre de contrôle, nous faisons toujours un essai à blanc sur l'eau désionisée employée; la valeur trouvée doit être sensiblement nulle. Divers dosages que nous avons effectués sur l'eau désionisée, après concentration au 1/20 nous ont montré qu'elle contenait entre 40 et 100 γ /l. de sodium et un taux semblable de potassium; nous n'en avons donc tenu compte que si l'essai à blanc sans concentration paraissait, au photomètre, s'écarter de ces valeurs. Pour effectuer le dosage, nous utilisons tantôt le spectrophotomètre de flamme de Beckman très sensible, tantôt le photomètre de flamme Jouan qui est un appareil à filtres, moins sensible, mais néanmoins d'une sensibilité bien suffisante pour doser les ions sodium et potassium aux concentrations où nous nous trouvons et qui est d'un maniement plus agréable. (Nous dosons le sodium à la longueur d'onde de 5.890 Angström et le potassium à 7.665 Angström).

B) - Etude critique de la méthode employée.

Cette méthode, employée par CONWAY et DUGGAN (50) pour *Saccharomyces cerevisiae*, suppose que, dans tous les cas, tous les ions sodium et potassium contenus dans la levure se répartissent de façon homogène dans le liquide en suspension. Avant de l'adopter, nous avons voulu comparer les résultats que fournit l'ébullition pendant des temps variables avec la minéralisation dont nous pensions qu'elle nous permettrait de libérer les ions d'une façon plus irréprochable. Nous avons voulu aussi nous rendre compte de l'importance du nombre des lavages, de la durée totale de l'opération pendant laquelle il n'est pas exclu que des échanges d'ions aient lieu entre les cellules et l'eau désionisée dans laquelle elles baignent.

1°) Influence du mode de mise en solution des cations de la levure:

a) Minéralisation:

Nous plaçons une prise d'essai de 10 ml de suspension de levure, par exemple, dans une capsule de platine et y ajoutons 2 ml d'une solution à 10 p.100 de nitrate d'ammonium R.P. Nous évaporons au bain-marie puis séchons à l'étuve. Nous traitons alors l'échantillon au four électrique sans dépasser 300° C, pour éviter la volatilisation des chlorures, et nous poursuivons l'opération jusqu'à obtention de cendres blanches. Après refroidissement, nous reprenons par 10 ml de ClH pur dilué à 20 p.100. Nous passons la solution obtenue au photomètre de flamme.

b) Ebullition:

Nous effectuons l'ébullition soit à feu nu, soit à l'aide d'un bain d'huile et sous réfrigérant ascendant. Nous avons utilisé l'ébul-

lition à feu nu au début de notre travail et lorsque nous étions amené à réaliser de nombreux dosages en série dans un court laps de temps, par exemple lorsque nous avons étudié les variations en ions en fonction du temps.

Nous portons à l'ébullition pendant 2 mn . et, après refroidissement, nous complétons au volume initial et passons la solution au photomètre de flamme. Cette méthode a l'inconvénient de présenter des risques de projections au cours de l'ébullition et il peut y avoir carbonisation sur les parois des récipients: aussi, chaque fois que nous l'avons pu, avons-nous préféré utiliser un bain d'huile qui permet de chauffer la suspension en expérience d'une façon plus satisfaisante. Nous plaçons la prise d'essai dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant et qui se trouve dans un bain d'huile. Nous chauffons jusqu'à ébullition de la suspension aqueuse et poursuivons doucement l'opération pendant deux minutes. Après refroidissement, nous complétons au volume initial. Dans les deux cas, nous passons au photomètre de flamme. Nous avons constaté qu'une centrifugation, dans le but d'éliminer les membranes cellulaires, est inutile car elle ne modifie pas les résultats.

Nous avons préféré utiliser la méthode par ébullition car, outre qu'elle est d'un emploi plus facile, elle nous a toujours fourni des valeurs supérieures pour un même échantillon. Cela tient sans doute à la difficulté d'éviter le "phénomène de grimpage" dans la capsule de platine et à la difficulté d'obtenir des cendres blanches sans dépasser une température peu élevée.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux n° 2 et 3.

Ils montrent que la méthode est valable en faisant la comparaison entre ébullition et minéralisation.

2°) Influence des conditions de lavage des culots de levure: nombre, durée, température:

Le milieu de culture est toujours riche en ions et les milieux que nous employons quelquefois sont fortement enrichis en sels. Il est donc nécessaire de les éliminer totalement par lavages avant de pratiquer le dosage des ions dans la levure. Le but que nous nous proposons dans ce qui suit est de voir si le nombre des lavages, le séjour plus ou moins prolongé dans l'eau désionisée qu'ils comportent, la température à laquelle nous opérons modifient les résultats des dosages des ions sodium et potassium contenus dans la levure.

On peut penser en effet que les cations diffusent et que leur teneur baisse en fonction du temps de contact de la levure avec l'eau; on peut aussi craindre qu'il se produise une lyse cellulaire qui éliminerait une partie des sels à doser dans les eaux de lavage.

Pour apprécier ces facteurs, nous avons poussé les choses à l'extrême et divisé des échantillons en deux fractions. Nous avons traité l'une des fractions aussi rapidement que possible avec de l'eau désionisée: nous avons effectué deux lavages et le temps de contact total avec l'eau désionisée a été estimé à vingt minutes, chaque lavage durant dix minutes, temps de centrifugation compris. C'est ce que nous appelons le "traitement rapide", tandis que nous traitons l'autre fraction après un temps de contact variable avec l'eau désionisée à la température du laboratoire: c'est ce que nous appelons le "traitement différé". Nous avons opéré avec des levures

riches en sodium (obtenues comme nous le verrons plus tard) dans l'espoir d'observer des différences notables et avons consigné nos résultats au tableau n° 4:

- Tableau n° 2 -

Etude comparative de la teneur en ions potassium et sodium de divers échantillons: dosage après minéralisation ou après ébullition.

(Les valeurs indiquées sur une même ligne horizontale ont été obtenues avec des suspensions différentes d'une même culture de levure. Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche.

	Na	K
Minéralisation	3,82 - 3,62	11,3 - 11,6
Ebullition	0,50 - 0,65	19 - 16,5
	0,50 - 0,83	16 - 17,4
	0,54 - 0,56	16,8 - 16,8
	0,70 - 0,95	17,9 - 21,8
	0,72 - 0,79	17,9 - 18,5
	4,07-4,17-4,26-4,32	2,49-2,49-2,48-2,82
	4,24-4,37-4,51-4,53	2,94-2,97-3,01-3,16

- Tableau n° 3 -

Comparaison entre minéralisation et ébullition sur un
même échantillon.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés
en mg/g de levure sèche).

	Na	K
Minéralisation	2,59 - 2,61	11,7
Ebullition	5,62	11,7
Minéralisation	5,5	13
Ebullition	5,8	16

- Tableau N° 4 -

Influence de la durée d'un contact préalable avec de l'eau désionisée sur la teneur d'une levure en ions sodium et potassium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Teneur en ions K ou Na	Durée du contact préalable (en minutes)						
	0	20	40	60	120	180	1060
Na	8,3	5,8	6,7	5,5	5,3	5	2,6
K	13,9	15,4	12	14,8	11,8	9,4	10

Les levures utilisées proviennent d'une culture de 24 h de la souche-mère sur milieu normal. Elles ont été récoltées puis placées pendant 4 h dans une solution de chlorure de sodium (1M/l).

Ce tableau montre qu'il est préférable d'opérer dans les conditions maximales de rapidité et à froid. Pour le sodium, il y a une légère chute assez rapide, puis un palier suivi d'une nouvelle chute lorsque le temps de contact avec l'eau désionisée se prolonge beaucoup. Pour le potassium, les variations sont moindres et plus lentes à se produire. TAKADA (51) avait déjà fait des constatations analogues aux nôtres: après lavage, il place les cellules dans l'eau distillée et analyse après 30 et 60 mn ; il constate qu'il n'y a pas de perte marquée de ces deux ions dans le temps de l'expérience. Nous avons voulu nous rendre compte si la levure adaptée à la concentration de une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre se comporterait comme la levure normale lorsqu'on la met en suspension dans de l'eau désionisée, mais comme avec la levure normale, la fuite du sodium était précoce et nous avons étudié seulement ce qui se passait au cours de la première heure de contact avec l'eau. Nous avons ainsi laissé en suspension la levure adaptée dans l'eau désionisée pendant 5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 45 - 60 minutes, temps auxquels il convient d'ajouter vingt minutes pour les lavages indispensables. Nous avons donc réalisé un temps de contact total avec l'eau désionisée de 25 - 30 - 35 - 40 - 50 - 65 - 80 minutes. Les résultats sont consignés au tableau n° 5. Ils montrent que la teneur en ions de la levure reste relativement stable pendant les 20 premières minutes.

C) Teneur en ions sodium et potassium de Candida utilis, souche-mère, cultivée sur des milieux de culture de richesse variable en ions sodium et potassium:

1°) Milieu normal:

- Tableau n° 5 -

Influence de la durée d'un contact préalable avec de l'eau désionisée sur la teneur en ions sodium et potassium d'une levure adaptée cultivée sur un milieu enrichi en chlorure de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Teneur en ions K ou Na	Durée du contact préalable (en minutes)							
	0	5	10	15	20	30	45	60
Na	6,6	6,3	6,5	6,1	5,5	5,3	4,7	4,4
K	2,9	2,3	2,5	2,5	2,7	2,5	2,5	2,3

Nous avons voulu apprécier dans quelles limites la teneur en ions sodium et potassium pouvait varier dans une même souche de levure cultivée dans des conditions aussi identiques que possible; la récolte a eu lieu après 24 h de culture alors que la densité optique de I20 - I30 était atteinte depuis plusieurs heures déjà.

Les variations que nous avons notées, nous ayant surpris par leur ampleur, nous avons multiplié le nombre des dosages; nos résultats sur 18 dosages qui figurent au tableau n° 6 sont: $0,90 \pm 0,43$ m/g de sodium et $16,50 \pm 5,10$ mg de potassium par gramme de levure sèche.

Les taux de sodium peuvent varier de 0,13 à 2,00 c'est-à-dire dans le rapport de 1 à 15; mais de toutes façons, le taux de sodium est très inférieur à celui du potassium dont les variations sont d'ailleurs de moindre amplitude (de 4 à 27, c'est-à-dire dans le rapport de 1 à 7).

Une même valeur de sodium (0,8 mg/g) peut s'accompagner de teneurs en potassium fort différentes: 8,6 et 19,4; une même teneur en potassium (17 mg/g) peut s'accompagner d'une teneur en sodium très faible (0,13 mg/g) ou assez forte (1,24 mg/g). Notons cependant que, à la plus forte teneur en sodium correspond la plus forte teneur en potassium (27 mg/g).

Le tableau n° 6 comporte aussi la valeur de la somme des ions sodium et potassium; la valeur du potassium étant toujours très supérieure à celle du sodium, la somme de ces deux ions reflète surtout le taux du potassium.

2°) Milieux enrichis en chlorure de sodium:

a) Milieu contenant 150 milliéquivalents de sodium par litre:

- Tableau N° 6 -

Teneur en sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère)
cultivée sur milieu normal.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g
de levure sèche).

Na	K	Na + K	Na	K	Na + K	Na	K	Na + K
0,13	17,80	17,93	0,75	18,20	18,95	1,00	4,00	5,00
0,35	15,60	15,95	0,82	19,40	20,22	1,20	9,30	10,50
0,55	16,80	17,35	0,85	8,60	9,45	1,21	14,10	15,31
0,57	17,70	18,27	0,90	23,00	23,90	1,24	16,60	17,84
0,60	23,00	23,60	0,90	16,00	16,90	1,54	20,00	21,54
0,66	16,7	17,36	0,97	13,80	14,77	2,00	27,00	29,00

La souche-mère, cultivée d'abord sur milieu normal, est ensuite ensemencée sur un milieu de culture enrichi en chlorure de sodium (150 m.eq./l de sodium). Nous récoltons au bout de vingt quatre heures de culture; la croissance n'est pas modifiée par rapport à celle que l'on obtient sur milieu normal. La teneur en ions sodium et potassium de cette levure est indiquée au tableau n° 7.

Par rapport à la souche-mère cultivée sur milieu normal, le sodium a augmenté de façon importante. Son taux reste cependant parfois inférieur à celui rencontré dans la culture sur milieu normal; la moyenne de nos valeurs (2,9 mg/g) est cependant trois fois plus élevée que celle (0,9 mg/g) notée précédemment; elle reste cependant faible. Le potassium a légèrement augmenté (22 contre 16,5 mg/g), ce qui nous paraît surprenant, l'entrée du sodium dans la cellule étant généralement accompagnée d'une sortie de potassium. La somme sodium + potassium a augmenté du tiers environ.

b) Milieu contenant 600 milliéquivalents de sodium par litre:

Nous ensemençons la levure sur un milieu normal enrichi à 600 m.eq./l de sodium. Nous récoltons au bout de 24 h; la densité optique est alors de 89. La teneur en ions sodium et potassium de cette levure est indiquée au tableau n° 8.

D'après ce tableau, nous voyons que la levure normale cultivée sur milieu à 600 m.eq./l de sodium, contient en moyenne 5 mg de sodium par gramme de levure sèche contre 2,9 mg lorsque le milieu contient 150 m.eq./l de sodium et 0,9 lorsqu'il en contient 2 environ. Le taux de potassium (16 mg/g) est du même ordre que celui

- Tableau n° 7 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère)
cultivée sur un milieu normal mais enrichi à 150 m.eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de
levure sèche).

Expériences n°	I	II	III	IV	Moyennes
Na	1,0	2,0	4,0	4,7	2,9
K	17,0	24,0	27,0	20,0	22,0
Na + K	18,0	26,0	31,0	24,7	24,9

- Tableau N° 8 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère)
cultivée sur un milieu normal enrichi à 600 m.eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de
levure sèche).

Exp. n°	I	II	III	IV	V	Moyennes
Na	3,4	4,5	4,7	5,5	5,6	5,0
K	15,0	15,0	17,0	20,0	14,7	16,0
Na + K	18,4	19,5	21,7	25,5	20,3	21,0

noté avec la levure normale; l'augmentation paradoxale de potassium signalée par emploi du milieu à 150 m.eq./l de sodium ne s'est donc pas maintenue mais, le fait que la forte augmentation du sodium n'ait pas provoqué une forte chute de potassium reste déjà digne d'être noté. La somme sodium potassium varie peu. Globalement, la levure réagit donc peu à l'augmentation de pression osmotique du milieu, puisque le total des ions sodium et potassium est du même ordre de grandeur que celui observé dans la levure cultivée sur milieu normal.

c) Milieu contenant 1000 milliéquivalents de sodium par litre:

Nous ensemençons la levure normale sur un milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1 M/l); la teneur en ions sodium et potassium de cette levure est indiquée au tableau n° 9. Ce tableau offre des résultats très différents de ceux rencontrés jusqu'ici. En effet, alors qu'on aurait pu croire que la teneur de la levure en sodium continuerait à augmenter en même temps que la concentration du milieu extérieur en cet ion, on observe une sensible diminution (3,5 mg/g contre 5 mg/g) avec un milieu contenant seulement 600 m.eq./l de sodium). En même temps que se produit une augmentation de sodium moindre que celle qui a été escomptée, on note un effondrement du taux de potassium (3 mg au lieu de 16 mg/g); si on compare ces valeurs à celles de la levure normale, on constate enfin le phénomène prévu; l'augmentation de la teneur en sodium s'accompagne d'une fuite du potassium, mais rappelons-le, ce phénomène ne s'était pas produit pour des richesses moindres du milieu extérieur en chlorure de sodium. Ces résultats d'apparence paradoxale méritent

- Tableau n° 9 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* , souche-mère)
cultivée sur un milieu normal enrichi à 1000 m. eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de
levure sèche).

Exp. n°	I	II	III	IV	V	VI	Moyennes
Na	3,3	3,3	3,3	3,5	3,7	3,7	3,5
K	4,1	4,0	4,2	4,1	1,4	1,4	3,2
Na + K	7,4	7,3	7,5	7,6	5,1	5,1	6,7

qu'une explication en soit cherchée. La somme des ions sodium et potassium a fortement diminué (6,7 mg/ contre 17 mg/g) dans la levure cultivée sur milieu normal. Nous verrons par la suite que l'eau intracellulaire baisse notablement lorsque la levure est plongée dans un milieu fortement hypertonique. Il en résulte que la diminution de la somme des ions sodium et potassium peut être interprétée comme un moyen de lutte contre une excessive hausse de pression osmotique endocellulaire que provoquerait une forte teneur en ions associée à une diminution du taux de l'eau.

Dans la mesure où on peut penser que les ions sodium et potassium sont les éléments qui interviennent le plus dans les variations de pression osmotique que nous avons observées, on peut calculer que le rapport des pressions osmotiques de la levure cultivée sur milieu normal à celui de la levure cultivée sur milieu enrichi en chlorure de sodium (1 M/l) est égal à l'unité. Donc, la pression osmotique de la levure n'aurait guère changé malgré la variation considérable de pression osmotique du milieu extérieur. Voici les éléments du calcul que nous avons fait:

- Levure cultivée sur milieu normal:

Teneur en eau: 70 p.100

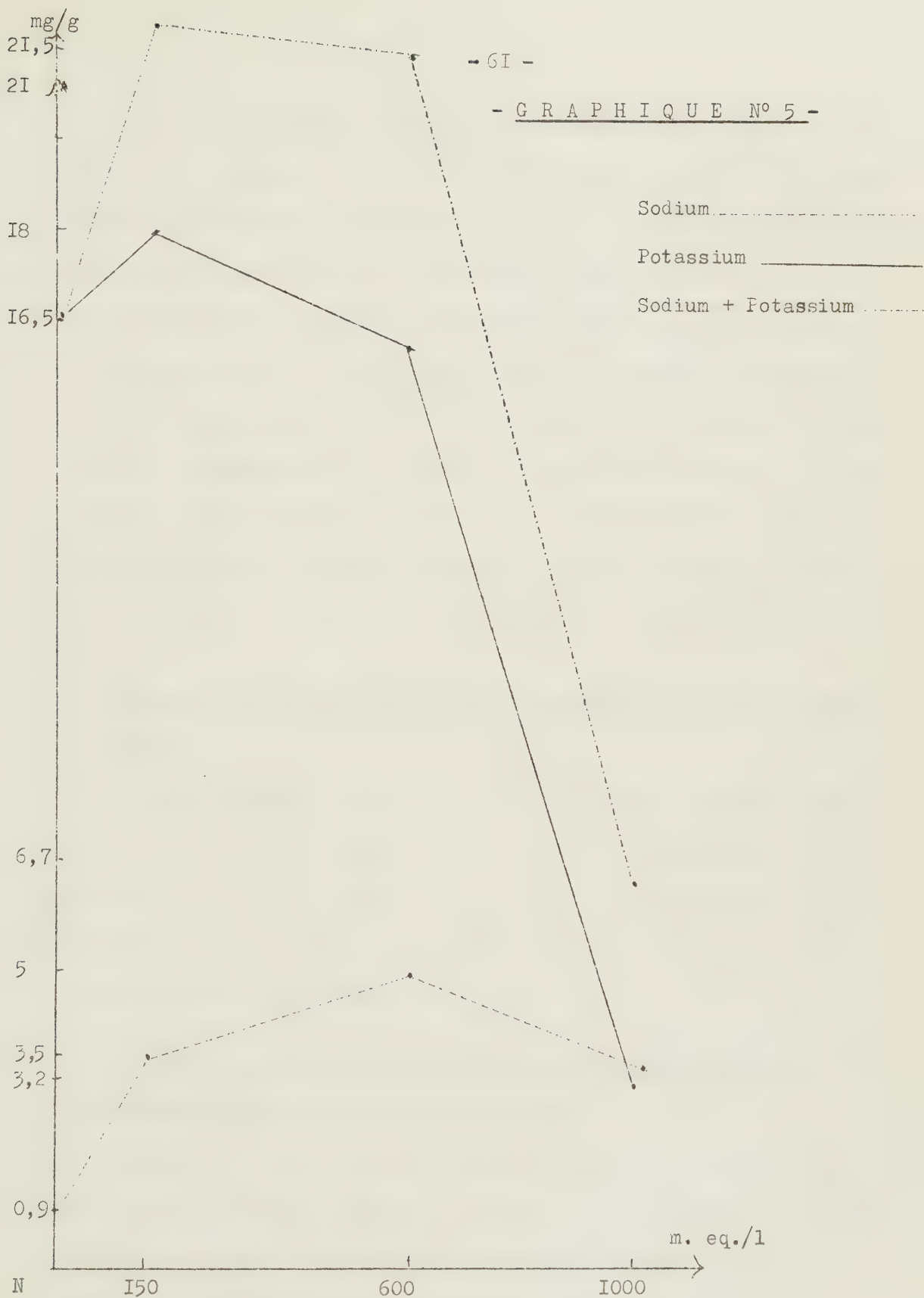
A 1 gramme de levure sèche correspond donc $\frac{70}{30} = 2,3$ g d'eau qui contient : $\frac{0,9}{23} + \frac{16,5}{39} = 0,46$ m.eq. de sodium et potassium

1 gramme d'eau contient donc: $\frac{0,46}{2,3} = 0,20$ m. eq. de sodium et potassium.

- Levure cultivée sur milieu enrichi en chlorure de sodium (1 M/l):

Teneur en eau: 50 p.100

A 1 gramme de levure sèche correspond donc 1 gramme d'eau intracellu-



Variation des ions sodium et potassium (en mg/g de levure sèche) dans *Candida utilis*, souche-mère, en fonction de la teneur en sodium du milieu de culture.

De ce qui précède, nous pouvons conclure que, lorsque la souche-mère de *Candida utilis* est cultivée sur des milieux enrichis en chlorure de sodium, la teneur de la levure en ions sodium et en ions potassium varie: le taux de sodium passe par un maximum puis s'effondre brutalement lorsque la concentration en chlorure de sodium du milieu atteint une molécule par litre. A ce moment, l'eau intracellulaire ayant diminué, la diminution de la teneur globale en ions sodium et potassium semble permettre à la cellule de levure de maintenir sa pression osmotique à sa valeur normale en dépit de la forte augmentation de pression osmotique du milieu extérieur. L'ensemble des résultats obtenus a été schématisé sur le graphique n° 5.

3°) Milieux enrichis en chlorure de sodium et en chlorure de potassium:

Jusqu'à présent, nous avons étudié la levure normale cultivée sur des milieux dans lesquels on faisait varier uniquement le taux de chlorure de sodium. Nous avons voulu voir les modifications qu'apporterait un changement de concentration portant à la fois sur le sodium et sur le potassium.

a) Milieu contenant à la fois 75 milliéquivalents de sodium et 75 milliéquivalents de potassium par litre:

Nous avonsensemencé la levure normale sur un milieu normal enrichi en chlorure de sodium à 75 m.eq./l et en chlorure de potassium à 75 m.eq./l . Nous avons effectué la récolte de la levure au bout de 24 h lorsque la densité optique atteignait 110-120.

Le tableau n° 10 montre que la teneur de la levure en ions change peu: le sodium reste absolument inchangé, le potassium

- Tableau n° 10 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère)
cultivée sur milieu normal enrichi à 75 m.eq./l de sodium et
75 m.eq./l de potassium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de
levure sèche).

Expériences n°	I	II	III	Moyennes
Na	0,8	0,92	1,16	0,99
K	22,0	22,0	20,0	21,33
Na + K	22,8	22,92	21,16	22,32

augmente légèrement; à une très forte augmentation de concentration ionique du milieu de culture, correspond une augmentation insignifiante du taux de la somme des ions sodium et potassium rapportée au poids sec de levure.

b) Milieux contenant 150 milliéquivalents de sodium par litre associé à des quantités variables de potassium.

Nous avons cultivé la levure normale sur un milieu normal mais enrichi à 150 m. eq./l de sodium en faisant varier la teneur en potassium du milieu. Nous avons donc ensemencé notre souche mère sur un milieu normal dont le taux de chlorure de sodium reste fixe (150 m.eq./l) mais dont le taux de potassium était tantôt de 15-7-30, tantôt 0 m. eq./l de potassium. Le taux du milieu normal est de 15 m.eq./l de potassium.

Les variations de la teneur en ions de cette levure sont indiquées au tableau n° II.

Nous voyons dans ce tableau que l'absence de potassium provoque une baisse du potassium et que le sodium augmente. Mais dès qu'il y a présence de potassium, le sodium varie peu quoi qu'il soit irrégulier. Le potassium augmente peu dans la levure, si on double son taux dans le milieu .

- Tableau n° II -

Variations en sodium et potassium de la levure normale cultivée sur milieu normal enrichi à 150 m.eq./l de sodium et contenant des taux variables de potassium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Teneur du milieu en K (en m.eq./l	Na	K	Teneur du milieu en K (en m.eq./l	Na	K
15	1,0	17,0	7	1,3	16,7
15	2,0	24,0	7	3,0	27,0
15	4,0	27,0	30	2,6	33,0
15	4,7	20,0	30	3,7	31,6
			0	6,0	9,3

D) - Teneur en ions sodium et potassium de la levure adaptée à se développer sur un milieu enrichi en chlorure de sodium à une molécule-gramme par litre, lorsqu'on la cultive sur des milieux de culture de richesses variables en ions sodium et potassium:

1°) Milieu normal:

Nous avons voulu nous rendre compte si *Candida utilis* que nous avons adapté à proliférer sur des milieux enrichis en chlorure de sodium conservait une certaine richesse en sodium après un passage sur le milieu normal. Dans ce but, nous avons donc cultivé une levure adaptée sur le milieu normal et l'avons récoltée au bout de 24 h de culture à la densité optique de 120-130. Les résultats de nos dosages sont consignés au tableau n° 12.

Lorsque nous comparons la levure adaptée à sa souche-mère, toutes deux étant cultivées sur le milieu normal, nous voyons que la valeur moyenne du sodium est presque doublée dans la levure adaptée mais que sa valeur maximale ne dépasse guère la valeur maximale de la levure normale cultivée sur le milieu normal. Le taux de potassium est du même ordre de grandeur dans les deux souches.

2°) Milieu normal enrichi à 500 et à 600 milliéquivalents de sodium par litre:

Nous avons voulu nous rendre compte des variations de la teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* en cours d'adaptation. Pour cela, nous avons effectué des dosages sur la levure qui avait été entraînée progressivement à croître sur des milieux enrichis en chlorure de sodium. Nous avons effectué des dosages sur cette

- Tableau n° I2 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur le milieu normal.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Exp. N°	I	II	III	IV	V	VI	Moyennes
Na	I,3	I,4	I,4	I,6	I,6	2,2	I,6
K	2I,I	2I,0	22,0	22,4	22,8	22,0	2I,8
Na + K	22,4	22,4	23,4	24,0	24,4	24,2	23,4

levure entraînée aux milieux contenant 500 et 600 m.eq./l de sodium.

Les résultats qui figurent dans le tableau n° I3 montrent que le taux de sodium a considérablement augmenté par rapport à celui de la même souche mais cultivée sur milieu normal et le potassium a diminué de moitié. Si nous comparons la levure adaptée à sa souche-mère cultivée dans les mêmes conditions, nous voyons que le taux de sodium est à peu près identique mais dans la souche adaptée le potassium a diminué de moitié, tandis qu'avec la souche-mère, il faut attendre une concentration plus forte du milieu extérieur pour que le taux de potassium diminue.

3°) Milieu normal enrichi à 1000 milliéquivalents de sodium par litre:

Candida utilis a été entraînée à croître sur des milieux de plus en plus riches en chlorure de sodium. Nous avons effectué des dosages des ions sodium et potassium sur la levure ayant poussé sur un milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1M/l) , pensant qu'il y aurait une différence entre sa teneur en ions et celle de la levure cultivée sur le milieu à 600 milliéquivalents de sodium par litre. Les résultats , consignés au tableau n° I4, sont de $3,97 \pm 2,03$ mg/g pour le sodium et $3,70 \pm 2,30$ mg de potassium par gramme de levure sèche.

Le sodium est resté à peu près à la même valeur que sur le milieu précédent, (600 m.eq./l de sodium), mais le potassium a encore nettement diminué. Le taux de sodium et de potassium est sen-

- Tableau n° 13 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal mais enrichi à 500 - 600 m.eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

	Teneur du milieu en sodium (m.eq./l)			
	500	600	600	600
Na	5,0	3,5	3,6	5,4
K	17,2	11,0	11,0	10,0
Na + K	22,2	14,5	14,6	15,4

- Tableau N° I4 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal enrichi à 1000 m.eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Exp. N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Moy.
Na	1,80	2,00	2,00	2,60	3,00	3,10	4,20	4,40	6,80	6,80	7,00	3,97
K	0,70	5,00	6,00	4,00	8,00	0,60	3,00	3,00	1,60	4,00	5,00	3,70
Na+K	2,50	7,00	8,00	6,60	11,00	3,70	7,20	7,40	8,40	10,80	12,00	7,67

siblement le même pour nos deux souches de *Candida utilis*, la souche-mère et celle adaptée à vivre sur une concentration de chlorure de sodium d'une molécule-gramme par litre.

4°) Milieu normal enrichi à 1200 milliéquivalents de sodium par litre.

Nous avons poursuivi l'enrichissement du milieu en chlorure de sodium et avons effectué des dosages d'ions sur *Candida utilis* ayant poussé sur un milieu à 1200 m. eq./l de sodium. Le développement de notre souche est évidemment moins rapide et moins complet, la concentration en chlorure de sodium étant supérieure à celle à laquelle elle a pu être adaptée; nous avons récolté la levure au bout de 24 h de culture, la densité optique n'étant que de 34. Les résultats qui figurent au tableau n° 15 montrent qu'il ne se produit pas de variations sensibles dans les teneurs en sodium et en potassium lorsque la souche de *Candida utilis* adaptée à une concentration de 1000 m.eq./l de sodium est cultivée sur un milieu à 1200 m.eq./l. de sodium.

Lorsque la souche de *Candida utilis* adaptée à se développer sur milieu contenant du chlorure de sodium à la concentration de une molécule-gramme par litre, est placée sur milieu normal, elle conserve un taux de sodium plus élevé que la souche-mère (1,6 contre 0,9 mg/g de levure sèche). Lorsque celles-ci sont cultivées sur milieux très concentrés en chlorure de sodium (600, 1000, 1200 m.eq./l de sodium), nous constatons des phénomènes analogues: le taux de sodium augmente puis diminue, mais ces variations sont faibles en valeur absolue; le taux de potassium s'effondre plus ou moins rapide-

- Tableau n° 15 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal enrichi à 1200 m.eq./l de sodium.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

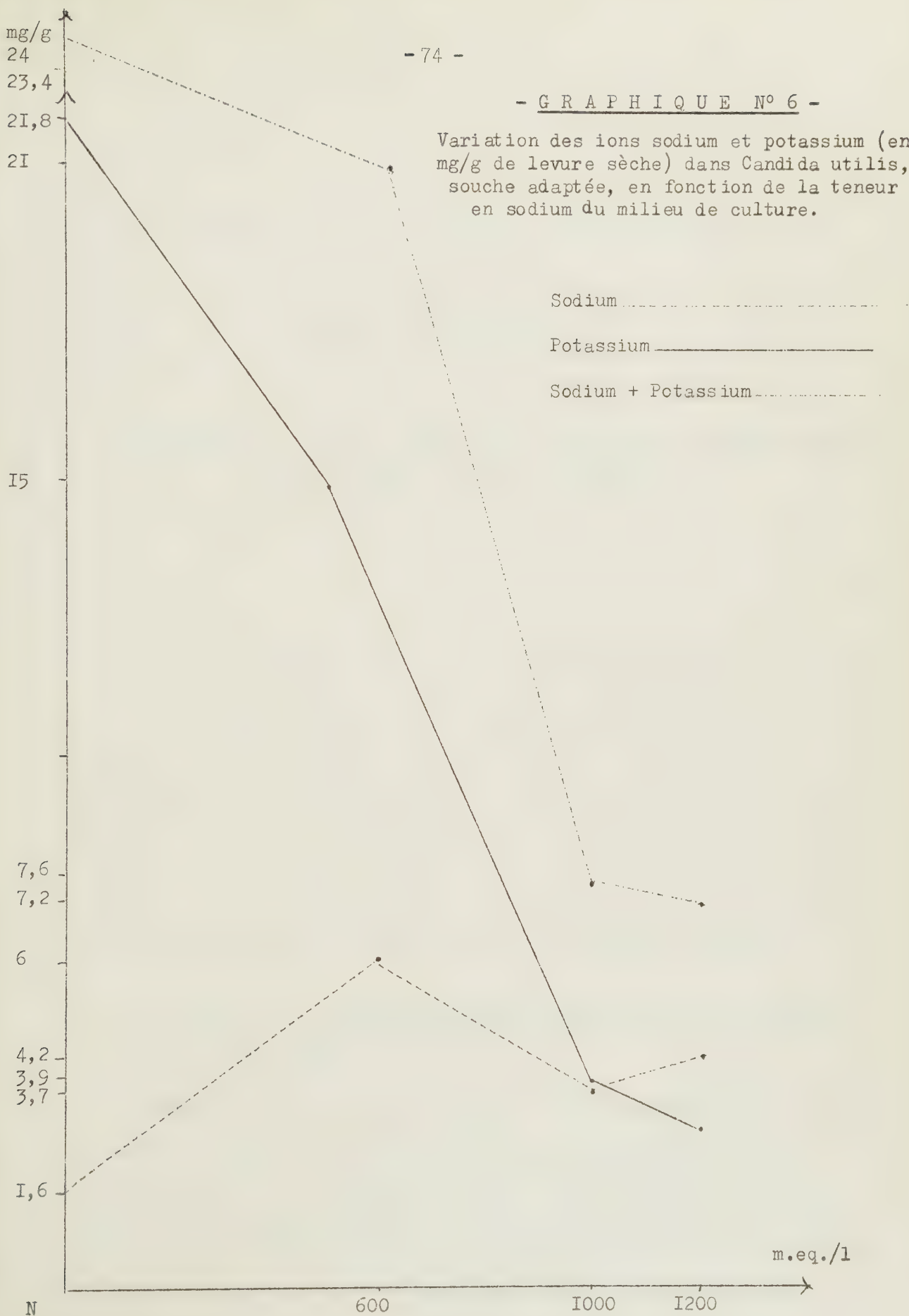
Expériences n°	I	II	III	IV	Moyennes
Na	4,1	4,2	4,2	4,4	4,2
K	3,6	2,3	3,7	2,6	3,0
Na + K	7,7	6,5	7,9	7,0	7,2

ment, après une augmentation transitoire dans le cas de la seule souche-mère. Les résultats obtenus avec la souche adaptée sont schématisés sur le graphique n° 6.

Les variations des ions que nous avons obtenues avec les différentes souches de levures au cours de ce chapitre ne nous ont pas permis de noter un comportement nettement différent entre la souche-mère et la souche adaptée à proliférer dans des milieux hypersalés. Cette dernière est seulement légèrement plus riche en ions; cette différence n'est vraiment nette que dans le cas où elle est cultivée sur le milieu normal; c'est alors surtout le potassium qui est augmenté si l'on compare à la souche-mère cultivée dans les mêmes conditions. Mais d'une façon générale, la teneur en ions des deux souches en présence de fortes pressions osmotiques est sensiblement la même; nous verrons au chapitre V que leur teneur en eau est aussi identique.

- GRAPHIQUE N° 6 -

Variation des ions sodium et potassium (en mg/g de levure sèche) dans *Candida utilis*, souche adaptée, en fonction de la teneur en sodium du milieu de culture.



- C H A P I T R E I V -

VARIATIONS DE LA TENEUR EN SODIUM ET EN POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS
DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons rassemblé en ce chapitre un grand nombre d'expériences très diverses qui toutes ont eu pour objet de provoquer des variations systématiques de la teneur de Candida utilis en sodium et en potassium dans le but d'analyser les causes déterminantes du mouvement des ions, et aussi dans le but de comparer le comportement de la souche-mère de Candida utilis avec la souche qui est apte à proliférer sur un milieu nutritif fortement enrichi en chlorure de sodium.

A) Influence de l'âge de Candida utilis sur sa teneur en sodium
et en potassium:

Nous avons d'une part envisagé la teneur en ions sodium et potassium de levures s'étant développées pendant un, deux ou trois jours, sur des milieux hypersalés puis, serrant le problème de plus près, nous avons dosé ces ions sur des prélèvements effectués de temps à autre, sur une même culture en milieu nutritif additionné d'une

molécule-gramme de chlorure de sodium par litre.

1°) Dosages effectués sur des cultures différentes d'âges différents:

Nous avons pensé que des cultures vieilles, ne proliférant plus, ne seraient peut-être plus à même de lutter aussi efficacement contre la surcharge ionique du milieu extérieur et verraient leur teneur en ions sodium augmenter de façon considérable. Nos premiers essais, dont les résultats figurent au tableau n° I6, nous ont détrompés.

Nous avons employé une souche de Candida utilis adaptée à se développer sur une concentration en chlorure de sodium d'une molécule-gramme par litre, et nous l'avons cultivée 24, 48 ou 72 heures sur ce même milieu ou sur un milieu deux fois plus concentré en sodium.

Il nous semble, d'après les chiffres rapportés au tableau n° I6 qu'il n'y ait pas de différence nette dans la teneur de la levure en ions sodium et potassium lorsqu'on prolonge la culture sur le même milieu.

2°) Dosages effectués sur une même culture à des âges différents:

Nous avons employé la même souche que dans les expériences précédentes et l'avons cultivée sur le milieu auquel elle était adaptée, contenant donc 1000 m.eq./l de sodium; des prélèvements effectués de manière stérile ont été opérés au bout de 9, 10, 11, 14, 15, 16, 22, 23, 27, 28, 45 et 72 heures de culture dont la prolifération a été suivie par mesures simultanées de la densité optique.

- Tableau n° I6 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal enrichi à 500 et 1000 m.eq./l de sodium en fonction de l'âge de la culture.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

	Teneur du milieu en sodium (m.eq./l)			
	500		1000	
Durée de la culture en heures	Na	K	Na	K
24	5,0	17,2	3,7	3,9
48	5,3 8,4 8,7	13 20,0 18,0	1,4 - 1,6 1,6 - 2,8 3,2 - 6,8 3,7	4,0 - 3,0 4,0 - 2,0 4,0 - 3,0
72	7,2	13,0		

Les résultats qui figurent au tableau n° I7 montrent que le taux de sodium augmente nettement pendant la phase de croissance logarithmique pour se maintenir ensuite à un taux voisin du taux initial pendant quarante huit heures au moins; au bout de 72 h, une très forte chute de la teneur en sodium est notée; semblable chute n'avait pas été observée dans l'expérience précédente. Nous pensons, comme cela a déjà été indiqué pages 59 et 60 , que la levure âgée lutte moins efficacement contre la pression osmotique élevée du milieu extérieur et lui abandonne de l'eau et des sels de façon à maintenir sensiblement constante la pression osmotique de ce milieu intérieur.

Le taux du potassium, qui était faible comme toujours lorsqu'il s'agit de levures cultivées sur milieux enrichis en chlorure de sodium n'a pas subi de variations importantes; au bout de 72 h, on note cependant qu'un effondrement du taux de potassium accompagne l'effondrement du taux de sodium.

B) Influence de l'immersion de Candida utilis dans des solutions chlorurées sodiques concentrées sur sa teneur en ions sodium et potassium en présence ou non de glucose et de phosphate monopotassique.

I°) Dans une première série d'expériences, nous avons employé Candida utilis, souche-mère, provenant d'une culture faite sur milieu normal et récoltée lorsque la densité optique maximale était atteinte. Après centrifugation et lavages, le culot de levure était mis en suspension pendant des temps variables dans un milieu glucosé à 9,06 par litre, comme dans le tampon de WARBURG, mais qui, privé d'azote, ne permet

- Tableau n° I7 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal enrichi à 1000 m.eq./l de sodium en fonction de l'âge de la culture.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Durée de la culture en heures	D. O.	Na	K
10	32	8,0	2,8
11	37	14,6	3,1
14	48	6,2	1,9
15	58	6,5	2,5
16	63	7,3	1,5
23	65	6,8	1,6
27	75	5,7	2,9
28	76	5,5	4,6
45	80	4,9	2,0
72	110	0,7	0,2

pas sa prolifération, et contenant en outre du phosphate monopotassique $M/I5$ et des quantités de chlorure de sodium telles que la concentration du milieu était de 1000, 1250, 1500, 1750 m.équ./l. de sodium.

Les résultats figurent au tableau n° 18.

De prime abord on voit qu'ils établissent, ce qui était prévisible, qu'une forte pénétration du sodium est accompagnée d'une très importante sortie du potassium cellulaire; ces mouvements d'ions ne sont absolument pas stoechiométriques, ni réguliers. Quelquefois, l'entrée du sodium est rapide, très forte et suivie d'une sortie d'une importante fraction de ce qui était entré; d'autres fois, la teneur de la levure en sodium n'est pas modifiée pendant les premières heures, et n'augmente que par la suite.

2°) Dans une deuxième série d'expériences, nous nous sommes adressé à la souche de *Candida utilis* que nous avons adaptée à se développer en milieu hypersalé. Nous l'avons cultivée sur son milieu habituel (contenant une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre) et lorsque la densité optique maximale a été atteinte, la culture a été centrifugée et le culot mis en suspension dans des milieux incapables d'assurer la prolifération: ces milieux contenaient 9,06 g de glucose par litre et du phosphate monopotassique $M/I5$ et des taux variant de 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 m. eq./l de sodium, sous forme de chlorure de sodium.

Les résultats, portés au tableau n° 19, montrent une chute importante et rapide de la teneur de la levure essayée en sodium et potassium lorsque ces deux ions sont relativement abondants dans l'échantillon à l'instant initial; dans un échantillon où la teneur initiale

- Tableau n° 18 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère) cultivée sur un milieu normal après mise en suspension dans des solutions contenant des taux croissants de chlorure de sodium et 9,06 g/l de glucose pendant des temps variables.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Taux de chlorure de sodium en m.eq./l	1000			1250			1500			1750		
Temps de contact en heures	N	K	Na+K	Na	K	Na+K	Na	K	Na+K	Na	K	Na+K
0	0,6	23,0	23,6	2,0	27,0	29,0	2,0	27,0	29,0	2,0	27,0	29,0
7	10,0	6,0	16,0	5,0	2,0	7,0	4,0	2,0	6,0	2,0	2,0	4,0
24	5,0	2,0	7,0	4,0	2,0	6,0	3,0	1,0	4,0	3,0	1,0	4,0

- Tableau n° 19 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur un milieu normal enrichi à 1000 m. eq./l de sodium après mise en suspension dans des solutions contenant des taux croissants de chlorure de sodium et 9,06 g/l de glucose pendant des temps variables.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Taux de ClNa en m.eq. par l.	2000		2500		3000		3500		4000		5000	
Temps de contact en heures	Na	K	Na	K	Na	K	Na	K	Na	K	Na	K
0	13,0	11,0	13,0	11,0	13,0	11,0	6,0	3,0	6,0	3,0	6,0	3,0
4							2,7	2,0	2,3	1,0	5,0	2,0
7	3,0	2,0	7,0	3,0	3,0	2,0						
24	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0	0,8	2,2	1,0	4,4	2,0	6,0	2,0

en sodium et potassium était plus faible, la teneur en sodium a peu varié, celle en potassium a, comme toujours, nettement diminué.

3°) Dans une troisième série d'expériences, la souche-mère a étéensemencée sur un milieu enrichi en chlorure de sodium (1 M/l); nous avons dit (page 27) que la croissance est lente, incomplète, mais cependant suffisante pour atteindre la densité optique de 67-70 en 48 h. A ce moment, la levure est récoltée par centrifugation, lavée et mise en suspension dans des solutions glucosées à 9,06 g/l, additionnées de chlorure de sodium en quantité suffisante pour réaliser des concentrations de 2000, 2500, 3000 m.eq./l de sodium.

Les résultats (tableau n° 20) sont très nets en ce qui concerne la teneur en potassium: la levure adaptée est déjà relativement pauvre en cet élément (3,70 mg/g au lieu de 16,50 mg/g chez la souche-mère); l'immersion dans un milieu fortement enrichi en chlorure de sodium diminue encore cette teneur, la diminution s'accroissant en fonction du temps de contact. Par contre, alors que nous nous attendions à noter une très forte augmentation du taux de la levure en sodium, nous n'avons observé que des faibles variations qui, après une augmentation transitoire, étaient suivies d'une diminution.

Au total, la mise en suspension dans ces diverses solutions hypersalées de *Candida utilis* (souche-mère comme souche adaptée à proliférer en milieux hypersalés) amène une chute rapide de la teneur de la levure en potassium, tandis que la teneur en sodium augmente modérément pour diminuer ensuite. La teneur totale en ions sodium et potassium est toujours fortement abaissée, comme nous l'avons dit page 59.

- Tableau n° 20 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche-mère) cultivée sur un milieu normal enrichi à 1000 m.eq./l de sodium après mise en suspension dans des solutions contenant des taux croissants de chlorure de sodium et 9,06 g/l de glucose pendant des temps variables.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Taux de chlorure de sodium en m.eq./l	2000			2500			30000		
	Na	K	Na + K	Na	K	Na + K	Na	K	Na + K
Temps de contact en heures									
0	3,5	4,0	7,5	3,5	4,0	7,5	3,5	4,0	7,5
7	4,0	3,0	7,0	6,0	1,0	7,0	3,0	1,0	4,0
24	2,0	0,4	2,4	0,7	0,2	0,9	2,0	0,5	2,5

Nous pensons que la levure finit par céder de l'eau intracellulaire au milieu hypertonique dans lequel elle baigne et que, pour maintenir sa pression osmotique constante, elle laisse également fuir des sels.

C) Influence de l'immersion de Candida utilis dans un milieu enrichi en chlorure de sodium, sur sa teneur en ions sodium et potassium en absence de glucose et de phosphate monopotassique.

Candida utilis (souche adaptée) est cultivée pendant 24 h sur milieu normal enrichi à 1000 m. eq./l de sodium, puis est mise en suspension dans des solutions non proliférantes pendant des temps variables au bout desquels le sodium et le potassium sont dosés. Les résultats sont consignés au tableau n° 2I et montrent que la teneur de la levure en sodium, bien que relativement forte, ne varie guère en fonction du temps tandis que la teneur en potassium, qui était relativement faible, continue à décroître; au total, la somme du sodium et du potassium contenus dans la levure n'a pas beaucoup baissé par suite de son immersion dans des solutions privées de chlorure de sodium.

D) Influence de l'âge des cellules de levure sur les variations en sodium et en potassium que provoque l'immersion dans un milieu enrichi en chlorure de sodium en absence de glucose et de phosphate monopotassique.

La souche de Candida utilis adaptée à se développer sur un milieu contenant une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre est cultivée sur ce milieu pendant des temps variables, et placée aussitôt pendant quinze heures dans une solution de chlorure de sodium (3 M/l).

- Tableau n° 2I -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur un milieu normal enrichi à 1000 m.eq./l de sodium, après mise en suspension dans une solution contenant 3000 m.eq./l de sodium pendant des temps variables.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Temps de contact en heures	Na	K
0	6,8	1,6
2	7,7	0,8
3	6,8	0,8
6	6,7	0,6
7	6,0	0,6

Nous voyons, d'après les résultats portés au tableau n° 22 que la teneur en sodium qui était élevée diminue de moitié, même avec une levure jeune pendant que la teneur en potassium s'effondre. Lorsque l'expérience est faite sur une culture âgée de 72 h, la teneur de la levure en ces deux éléments est devenue très basse. La levure âgée lutte moins bien que la levure jeune contre l'hypertonie du milieu dans lequel elle plonge.

E) Evolution de la teneur en sodium et en potassium de Candida utilis lorsqu'elle est placée pendant une à quatre heures dans un milieu glucosé tamponné:

Nous avons placé les différentes levures récoltées à leur densité optique maximale pendant 1 - 2 - 3 - 4 heures dans des solutions contenant 9,06 de glucose dissous dans un litre de tampon de phosphate monopotassique M/15, contenant ou non M/I de sodium par litre. Nous indiquons les variations obtenues dans la teneur en ions de Candida utilis soumise à différentes conditions dans le tableau n° 23 où nous avons mentionné les rubriques suivantes:

a) Dans le cas de la souche-mère de Candida utilis plongée dans le milieu tampon glucosé sans sodium: le sodium ne change pas et le potassium augmente (il abonde dans le tampon).

b) La même levure placée sur le milieu tampon glucosé additionné de sodium donne les variations suivantes: le sodium augmente et le potassium décroît; les mouvements de ces ions ne sont cependant pas stoechiométriques ni simultanés.

c) La même levure placée sur un milieu glucosé (9,06 g par litre), salé (1M/l de chlorure de sodium) mais non tamponné voit sa

- Tableau n° 22 -

Teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée) cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1 M/l) récoltée à des temps de culture et des densités optiques différents puis mise en suspension pendant 15 h dans une solution de chlorure de sodium 3 M.

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Durée de la culture	Densité optique (x 100 au moment du prélèvement)	Na	K
9	28	9,10	5,00
10	32	4,00	0,76
11	37	4,00	0,60
14	48	4,00	0,40
72	110	1,20	0,17

Variation de la teneur en ions sodium et potassium de Camida utilis mis en suspension pendant des temps croissants dans des solutions différentes (les numéros du tableau sont indiqués dans le texte et expliquent chaque essai).

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en milligrammes par gramme de levure sèche)

N° de l'essai.	Na					K				
	0	I	2	3	4	0	I	2	3	4
Temps de contact en heures										
a	I	0,5	I,0	0,5	0,2	I4,0	20,0	22,0	24,0	25,0
	2	0,4	0,1	0,1	0,1	21,0	23,0	26,0	29,0	31,0
b	I	0,5	4,0	3,0	2,0	I4,0	9,0	10,0	7,0	5,0
	2	0,4	12,0	13,0	8,0	21,0	15,0	13,0	13,0	11,0
c		0,9	5,0	6,0	6,0	23,0	10,0	7,0	8,0	7,0
d	I	1,5	I,3	I,6	2,3	3,0	5,0	7,0	8,0	7,0
	2	3,0	I,0	0,2	0,2	7,0	14,0	21,0	25,0	26,0
e	I	1,5	I,0	3,0	2,0	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0
	2	3,0	2,0	26,0	10,0	7,0	4,0	9,0	9,0	9,0
f		7,0	17,0		19,0	4,0	2,0	2,0		I,0
g	I	4,0	0,5	0,6	0,9	3,0	11,0	15,0	16,0	17,0
	2	9,0	I,0	I,0	2,0	6,0	24,0	23,0	35,0	37,0
	3	5,0	0,8	0,6	0,3	3,0	18,0	24,0	28,0	30,0
h	I	4,0	2,0	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	2,0	2,0
	2	9,0	5,0	7,0	4,0	6,0	7,0	6,0	4,0	3,0
	3	5,0	4,0	23,0	20,0	14,0	4,0	6,0	6,0	7,0

teneur en sodium augmenter rapidement en même temps que sa teneur en potassium diminue; les résultats sont du même ordre qu'en b, c'est-à-dire que le tampon de phosphate monopotassique ajouté à la solution glucosée salée ne modifie pas le mouvement des ions que nous avons signalé.

d) Dans le cas de la souche-mère cultivée sur milieu additionné de chlorure de sodium (IM/l) et placée dans le milieu glucosé tamponné, les résultats sont les mêmes qu'en a : le sodium est peu modifié, le potassium augmente.

e) Même expérience qu'en d, mais la solution glucosée tamponnée est additionnée de sodium: les résultats sont sensiblement les mêmes qu'en b.

f) La même levure que dans les expériences d et e est placée sur un milieu glucosé salé non tamponné: l'augmentation du sodium est rapide et considérable. La chute du potassium est importante. Là encore, nous voyons que la présence d'un tampon dans le milieu glucosé salé ne modifie pas le mouvement des ions.

g) La levure adaptée à proliférer sur les milieux hypersalés cultivée sur un milieu riche en chlorure de sodium (IM/l) est riche en sodium au départ. Celle-ci étant mise sur le tampon sans sodium, le sodium décroît, le potassium qui était faible augmente énormément.

h) Cette même levure utilisée dans g, mise sur le tampon contenant du sodium est le siège des variations suivantes: le sodium augmente beaucoup et le potassium ne change pas.

De cet ensemble d'expériences, nous pouvons conclure que les

deux souches de *Candida utilis* mises en oeuvre (la souche-mère et la souche adaptée à se développer sur un milieu hypersalé) se comportent de la même façon: placées sur un milieu glucosé et contenant du phosphate monopotassique, leur teneur en sodium ne varie guère, celle en potassium augmente; si le même milieu glucosé tamponné est additionné d'une molécule-gramme par litre de chlorure de sodium, la teneur des levures en sodium augmente beaucoup, celle en potassium diminue plus ou moins suivant sa valeur initiale.

(Voir les graphiques n° 7 et 8).

F) Influence de l'augmentation de la teneur du milieu de culture en certains de ses constituants:

Puisque, dans certains cas, les mouvements des ions à travers la paroi cellulaire sont actifs et liés au métabolisme de la cellule, nous avons cherché à stimuler celui-ci en augmentant la teneur du milieu de culture en certains métabolites (acides aminés ou saccharose) pour voir si la teneur en sodium et en potassium de la levure cultivée dans un milieu enrichi en chlorure de sodium se trouvait modifiée.

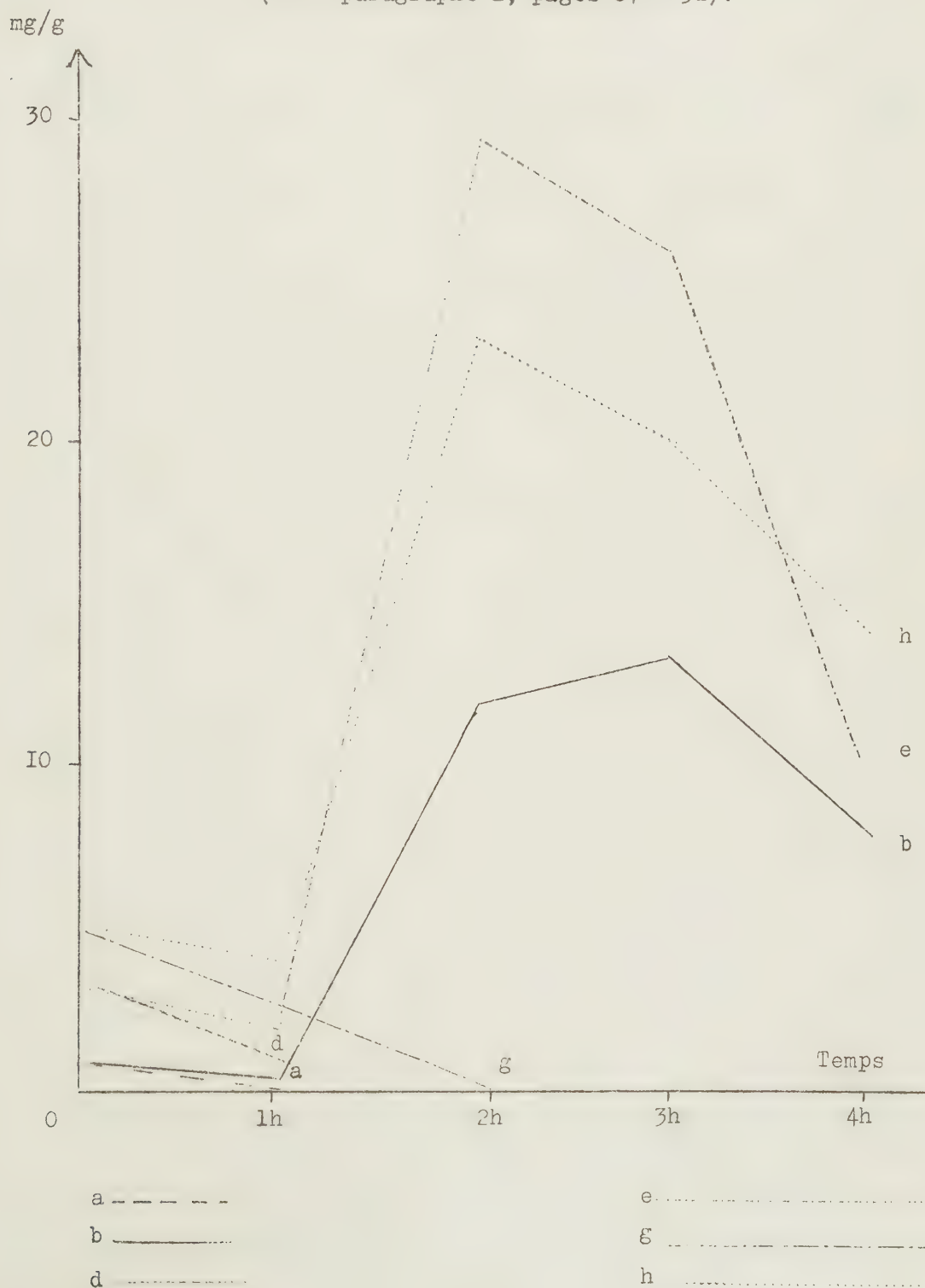
Nous avons employé notre souche adaptée à se développer sur milieu hypersalé, et nous l'avons cultivée sur notre milieu nutritif habituel additionné de chlorure de sodium (0,5 ou 1,0 M/l) et d'un excès de méthionine (0,2 g/l), de tryptophanne (0,2 g/l) ou de saccharose (20,60 ou 100 g/l).

Le tableau n° 24, dans lequel les résultats expérimentaux ont été consignés, montre que l'addition d'un excès de méthionine ou de tryptophanne au milieu de culture salé ne modifie pas la teneur de la levure en sodium ou en potassium. L'addition de saccharose ne fait

- G R A P H I Q U E N° 7 -

Evolution de la teneur en sodium de *Candida utilis* lorsqu'elle est placée pendant une à quatre heures dans un milieu glucosé tamponné.

(Voir paragraphe E, pages 87 - 91).



- GRAPHIQUE N° 8 -

Evolution de la teneur en potassium de *Candida utilis* lorsqu'elle est placée pendant une à quatre heures dans un milieu glucosé tamponné.

(Voir paragraphe E, pages 87-91)



a ————
b —————
d - - - - -

e
g - - - - -
h

- Tableau n° 24 -

Influence de la méthionine, du tryptophanne et du saccharose sur les variations de la teneur en ions sodium et potassium de *Candida utilis* (souche adaptée).

(Les poids de sodium et potassium sont exprimés en mg/g de levure sèche).

Additions faites au milieu de culture normal	Na	K	Na + K
ClNa 0,5 M/l	5,0	16,0	21,0
ClNa 0,5 M/l + méthionine 200 mg/l	4,9	15,0	19,9
ClNa 0,5 M/l + tryptophanne 200 mg/l	4,5	10,0	14,5
ClNa 1 M/l + saccharose 20 g/l	6,3	3,3	9,6
ClNa 1 M/l + saccharose 60 g/l	5,0	2,8	7,8
ClNa 1 M/l + saccharose 100 g/l	2,9	1,1	4,0

sentir un effet net sur la teneur de *Candida utilis* en sodium que lorsque sa concentration devient très élevée (10 p.100). L'action sur la teneur en potassium se fait sentir déjà pour des concentrations moindres. Il semble que le saccharose n'exerce pas une action spécifique mais que nous trouvions là encore un exemple de réaction de la levure à une trop forte tonicité du milieu extérieur; la levure serait obligée de céder de l'eau intracellulaire et pour que sa pression osmotique n'augmente pas, elle perdrait aussi des ions sodium et potassium.

La somme sodium + potassium qui était de 17,4 mg/g dans la levure initiale tombe à 4 mg/g lorsque la culture est faite en présence d'une forte concentration de saccharose.

G) Influence de certains stéroïdes :

L'élimination accrue des sels de potassium, l'accumulation des sels de sodium que provoque l'injection de certaines hormones surrénales ont amené les chercheurs à essayer de voir si l'action de ces hormones sur le mouvement des ions pourrait s'exercer sur d'autres systèmes que le rein et si d'autres molécules possédant un noyau stéroïde jouiraient également d'une action sur la pénétration des ions dans les cellules et sur leur sortie hors de celles-ci.

Nous avons d'ailleurs fait allusion à ces travaux dans notre introduction (page 12) et n'y revenons pas ici.

Les essais que nous avons effectués sont rapportés au tableau n° 25. Nous avons placé *Candida utilis* souche-mère provenant d'une culture de 24 h sur milieu normal pendant 4 h dans une solution contenant 1 M/l de chlorure de sodium et des quantités variables de gluco-

- Tableau n° 25 -

Teneur en ions sodium et potassium (mg/g levure sèche) de *Candida utilis* (souche-mère) cultivée sur un milieu normal puis mise en suspension pendant 4 h dans une solution de chlorure de sodium (1 M/l) contenant soit des glucosides tonicardiaques soit des corticostéroïdes.

	Na	K
Témoin	4,2 5,1	14,7 10,9
ouabaïne 0,1 mg p.100	4,7	14,7
ouabaïne 1 mg p. 100	5,4	11,2
ouabaïne 10 mg p. 100	3,5 4,5	16,5 14,2
digitaline 0,1 mg p. 100	3,2	10,8
digitaline 1 mg p. 100	4,8	10,8
digitaline 10 mg p. 100	5,3 6,0	19,1 14,0
percortène 10 mg p. 100	5,5	10,3
Percortène 50 mg p. 100	2,9	18,5
Percortène 500 mg p.100	3,3 3,8	14,0 11,2

sides tonicardiaques (ouabaine ou digitaline) ou de corticostéroïde. (Nous avons utilisé le Percortène hydrosoluble CIBA qui est un glucoside de déoxycorticostérone soluble dans l'eau).

Dans nos conditions expérimentales, aucun des stéroïdes employés n'a eu d'action vraiment nette et reproductible sur la teneur de *Candida utilis* en sodium et en potassium.

o
o o

- C H A P I T R E V -

=====

ACTION DU CHLORURE DE SODIUM SUR LA TENEUR EN EAU DE

CANDIDA UTILIS

Nous avons vu à diverses reprises dans ce qui précède que des levures mises en suspension dans des milieux hypersalés de concentration de plus en plus élevée, finissent par présenter une perte globale en sodium et en potassium alors qu'il aurait paru logique que le taux de ces cations continue à augmenter. Nous avons donc constaté qu'un mécanisme nouveau entre en jeu qui s'oppose à la pénétration passive du sodium dans la levure lorsqu'elle reste plongée dans un milieu de forte concentration en chlorure de sodium. Nous avons alors émis l'hypothèse que lorsque la pression osmotique du milieu extérieur dépasse une certaine valeur, la cellule de levure est obligée de laisser diffuser une partie de son eau intracellulaire. Le fait qu'une solution concentrée de saccharose se comporte comme une solution concentrée de chlorure de sodium vis à vis du mouvement des ions dans la levure, nous a paru un élément de valeur pour étayer notre thèse. La perte d'une fraction importante d'eau intracellulaire aurait pro-

voqué une forte augmentation de la pression osmotique interne et ce serait pour maintenir cette pression osmotique au voisinage de sa valeur normale que la levure expulserait sodium et potassium en même temps qu'elle perd de l'eau.

Pour vérifier cette hypothèse, il nous fallait donc doser l'eau intracellulaire de la levure dans différentes conditions expérimentales.

Pour pouvoir calculer le poids d'eau intracellulaire, il nous fallait tout d'abord calculer le poids d'eau intercellulaire d'un culot de centrifugation de levure. Connaissant le poids d'eau totale contenue dans le culot et le poids d'eau intercellulaire, nous pouvons par différence déterminer le poids d'eau intracellulaire.

La méthode consiste donc à faire un extrait sec pour obtenir la quantité d'eau totale d'un culot de centrifugation et estimer l'eau intercellulaire de ce même culot. Si les levures étaient sphériques et n'étaient pas déformées par la centrifugation, l'espace intercellulaire représenterait 26 p.100 du volume total, mais les levures étant de forme irrégulière et étant susceptibles de se grouper en amas ou en chaînes, ce chiffre de 26 p.100 ne peut être considéré que comme une indication.

D'après COOK (52), on peut mesurer le volume intercellulaire par emploi de solution de corps à poids moléculaire élevé: hémoglobine, inuline, gélatine, peptone qui sont dilués par l'eau intercellulaire. L'eau résiduelle, c'est-à-dire l'eau intracellulaire, peut être déterminée par perte de poids par séchage et on trouve 65 p.100 pour la levure commerciale pressée; on trouve des valeurs de 22 à 24 p.100 d'eau intercellulaire pour la levure centrifugée.

CONWAY (53), procède à la détermination de l'espace intercellulaire au moyen de l'inuline en solution à 3 p.100 et trouve un pourcentage de 21 p.100 d'eau intercellulaire; en utilisant la peptone, il trouve un espace intercellulaire de 23 p.100 et avec la gélatine, il obtient 21 p.100.

La teneur de la levure en eau dépend des conditions de croissance et de température. L'effet de la pression osmotique du liquide environnant a été souvent déterminé surtout pour évaluer la pression osmotique intérieure des levures. La plasmolyse n'a lieu que si la pression osmotique du milieu extérieur est élevée, ce qui fait sortir une partie du suc cellulaire à travers la membrane. DRABBLE (54) a pu diminuer le volume d'une cellule de levure de 430 à 160 μ^3 en portant le titre de la solution de chlorure de sodium dans laquelle elle baigne de 0,1 à 1M/l. Cela suggère que le chlorure de sodium n'a pas pénétré dans les régions internes de la levure.

Dans ce chapitre, nous nous sommes efforcé de déterminer l'espace intercellulaire tout d'abord des levures normale et adaptée cultivées sur milieu normal: pour cela nous avons utilisé la méthode à la peptone; puis nous avons essayé de déterminer l'espace intercellulaire des levures normale et adaptée cultivées ou mises en "resting cells" sur des milieux hypersalés: pour cela nous avons utilisé une méthode qui consistait à doser au photomètre de flamme le sodium contenu dans l'eau intercellulaire des culots de centrifugation.

A) Détermination de l'eau intracellulaire de la levure
cultivée sur milieu normal: méthode à la peptone.

1°) Estimation de l'eau intercellulaire:

Les levures sont récoltées, lavées deux fois par centrifugation. Les culots sont rassemblés: une partie aliquote est remise en suspension dans une solution à 10 p.100 de peptone pepsique. Nous centrifugeons et par décantation, nous éliminons la peptone surnageant le culot et parachevons cette opération par un assèchement rigoureux des parois du tube à centrifuger à l'aide de papier Joseph. Nous remettons alors le culot en suspension dans l'eau puis centrifugeons. Nous décantons le liquide surnageant et l'évaporons. Le poids de l'extrait sec, constitué par la peptone, représente le volume d'eau intercellulaire du culot.

2°) Détermination de l'eau totale:

Le restant du culot de levure est pesé à l'état humide et le poids de l'extrait sec est déterminé après passage à l'étuve à 105° C jusqu'à poids constant. De la différence de poids entre le culot humide et l'extrait sec, nous déduisons le poids d'eau total.

3°) Calcul de l'eau intracellulaire:

Nous pouvons alors calculer le poids d'eau intracellulaire par gramme de levure fraîche et l'exprimer en pourcentage. En effet, nous avons:

Poids du culot humide - poids de l'extrait sec = eau totale.

Eau totale - eau intercellulaire = eau intracellulaire.

4°) Exemple

Soit une levure cultivée pendant 24 h sur milieu normal. Après centrifugation, le poids du culot humide est: $P = 575,6$ mg. Poids de l'extrait sec de la solution de peptone à 10 p. 100 surnageante: $p = 16,5$ mg.

Volume d'eau retenue dans le culot humide:

$$p' = 10 p = 165 \text{ mg}$$

Poids de l'extrait sec du culot: $P' = 103,2$ mg

Eau intercellulaire p. 100 g de levure:

$$\frac{p' \times 100}{P} = \frac{165 \times 100}{575,6} = 28 \text{ p. 100}$$

Eau intracellulaire dans la P.E :

$$(P - p') - P' = (575,6 - 165) - 103,2 = 307,4 \text{ mg}$$

Eau intracellulaire pour 100 g de levure:

$$\frac{(P - p') - P'}{P - p'} \times 100 = \frac{307,4 \times 100}{410,6} = 73 \text{ p. 100}$$

Poids de levure sèche: 25 p.100 du poids de levure fraîche.

5°) Résultats

Le dosage de l'eau intercellulaire et de l'eau intracellulaire a été fait (par la méthode à la peptone), en quadruple exemplaire, sur deux échantillons de *Candida utilis* souche-mère et sur un échantillon de la même levure, souche adaptée à proliférer sur milieu hypersalé.

Les valeurs trouvées figurent au tableau n° 26 et donnent la même valeur d'eau intracellulaire, soit 73 p.100 pour ces deux souches cultivées l'une et l'autre sur notre milieu habituel.

Pour l'eau intercellulaire, les deux souches donnent également des valeurs sensiblement identiques soit environ 28 p.100; rappelons

- Tableau n° 26 -

Eau intracellulaire et intercellulaire de *Candida utilis* (souches mère et adaptée) cultivée sur un milieu normal pendant 24 h.

Le dosage a été réalisé par la méthode à la peptone.

Nature de la souche utilisée	Poids du culot humide en mg	Poids de l'extrait sec de la solution peptonée à 10% surnag. en mg	Poids de l'extrait sec des levures en mg	Eau intracellulaire pour cent	Eau intercellulaire pour cent
	P	p	P'		
	575,6	16,5	103,2	74	28
	596	20,2	112	71	33
	640,6	19,8	115,3	73	31
	737,6	24,4	131,8	73	33
	Moyenne des 4 expériences:			73	29
Souche mère	1588	50,2	298,7	73	31
	2663	72,2	505,7	74	23
	2578	72,6	483,4	74	28
	3152	80,1	608	75	25
	Moyenne des 4 expériences:			74	27
Souche adaptée au milieu	1417	40	271,1	73	28
	1406	38,5	268	74	27
	1720	48	327,6	74	27
	1592	44,3	308,3	73	27
	Moyenne des 4 expériences:			73	27

que CONWAY estimait le volume d'eau intercellulaire à 23 p.100, mais il s'agissait de *Saccharomyces cerevisiae* dont les dimensions sont différentes; *Candida utilis* est plus allongée et on comprend que son tassement par centrifugation puisse être plus irrégulier et donc qu'il y ait un plus grand volume d'eau retenue entre les cellules que dans le cas de *Saccharomyces* qui est presque sphérique.

B) Détermination de l'eau intracellulaire des levures cultivées ou placées sur des milieux hypersalés:

La méthode à la peptone nous a paru critiquable car en plongeant la levure provenant d'un milieu à forte concentration saline dans un milieu de faible pression osmotique, on pouvait craindre de provoquer des mouvements d'ions. Aussi avons-nous ensuite utilisé une peptone à 10 p.100 dans une solution à la concentration en chlorure de sodium correspondant à celle dans laquelle se trouvaient les levures en expérience. Les résultats étant inconstants, nous avons abandonné cette méthode et en avons adopté une dont le principe reste le même mais dans laquelle nous faisons appel au chlorure de sodium lui-même.

1°) Marche d'un essai

Les levures sont récoltées et lavées deux fois avec une solution de chlorure de sodium de même concentration que celle dans laquelle elles se trouvaient. Le culot de centrifugation est divisé en deux parties, A et B qui sont pesées. La détermination du chlorure de sodium contenu dans la fraction A se fait indirectement par dosage du sel retenu dans la fraction B. Après pesée, B est mis en suspension

dans 20 millilitres d'eau désionisée et après centrifugation, le sodium contenu dans l'eau surnageante est dosé à l'aide du photomètre de flamme. Si la concentration en chlorure de sodium de la solution intercellulaire est de une molécule-gramme par litre, il nous suffira de diviser par 23 le poids de chlorure de sodium retenu dans la partie B du culot pour connaître le poids d'eau intercellulaire. Connaissant le poids de chlorure de sodium de B, nous en déduisons facilement le poids de chlorure de sodium retenu dans A et donc le poids d'extrait sec sans sel de A. Le poids d'extrait sec sans sel de B est alors déduit par une règle de trois. Nous effectuons alors les calculs suivants:

L'eau totale contenue dans B est égale au poids de B diminué du poids de l'extrait sec de B.

L'eau intracellulaire est égale à l'eau totale diminuée de l'eau intercellulaire.

2°) Exemple d'un calcul numérique

La levure adaptée à proliférer sur un milieu contenant 1 M/l de chlorure de sodium est cultivée pendant 24 h sur ce milieu, puis centrifugée. Le culot est divisé arbitrairement en deux fractions A et B.

a) Poids de A (culot humide et salé) : $P_I = 272,2 \text{ mg}$

Poids de l'extrait sec (salé) de A: $p_I = 74,5 \text{ mg}$

b) Poids de B (culot humide et salé) : $P_2 = 1214,2 \text{ mg}$

B est mis en suspension dans 20 ml d'eau désionisée, centrifugé et l'eau surnageante est passée au photomètre de flamme; elle contient 612 mg de sodium par litre. Comme nous avons mis le culot en suspen-

sion dans 20 ml d'eau désionisée, nous déduisons que le culot contenait:

$$\begin{aligned} 0,612 \times 20 &= 12,24 \text{ mg de sodium,} \\ \text{soit } 12,24 \times \frac{58,5}{23} &= 31 \text{ mg de chlorure de sodium,} \\ \text{soit } C \text{ mg de chlorure de sodium.} \end{aligned}$$

Si P_2 contient C de chlorure de sodium, P_I contenait c

Le poids de chlorure de sodium contenu dans A est donc:

$$c = \frac{31 \times 272,2}{1214,2} = 6,94 \text{ mg}$$

A la fraction de culot A correspond donc un poids d'extrait sec non salé p'_I

$$P'_I = P_I - c = 74,5 - 6,94 = 67,6 \text{ mg.}$$

A la fraction de culot B correspond donc un poids d'extrait sec

$$p'_2 = \frac{P'_I \times P_2}{P_I} = \frac{67,6 \times 1214,2}{272,2} = 301,5 \text{ mg d'extrait sec.}$$

Le poids d'eau totale contenu dans B est

$$P_3 = P_2 - p'_2$$

$$P_3 = 1214,2 - 301,5 = 912,7 \text{ mg d'eau totale.}$$

Le poids d'eau intercellulaire contenu dans B est

$$P_4 = \frac{b}{23} = \frac{12,24}{23} = 0,532 \text{ ml} = 532 \text{ mg}$$

soit

$$\frac{532 \times 100}{1214} = 43 \text{ g pour 100 g de levure humide.}$$

Le poids d'eau intracellulaire contenu dans B est

$$P_5 = P_3 - P_4 = 912,7 - 532 = 380,7 \text{ mg}$$

soit

$$\frac{380,7}{380,7 + 301,5} \times 100 = 56 \text{ g pour 100 g de levure fraîche.}$$

3°) Résultats

Nous avons déterminé l'eau intracellulaire et par la même occasion l'eau intercellulaire:

a) des cellules de notre souche-mère mises en culture pendant 48 h sur milieu nutritif additionné d'une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre:

Les valeurs trouvées sont consignées au tableau n° 27.

Nous avons fait quatre expériences en quadruple exemplaire.

La moyenne de ces 16 expériences donne 49 p.100 d'eau intracellulaire. Les variations sont comprises entre 44 et 53 p.100, donc de l'ordre de $\pm 4,5$ soit au maximum ± 10 p.100.

La levure normale cultivée sur milieu normal contenait en moyenne 73 p.100 d'eau intracellulaire (v. page 102). On pouvait donc penser qu'en plaçant les levures sur des milieux hypersalés, il y avait une pénétration d'ions ou une sortie d'eau. La première hypothèse s'est avérée fausse puisque le potassium baissait énormément, que le sodium n'augmentait que peu et qu'ainsi la somme (sodium + potassium était fortement diminuée. La deuxième hypothèse s'impose au contraire: du fait que l'eau intracellulaire a diminué d'environ un tiers de sa valeur normale, la pression osmotique intracellulaire aurait pu augmenter considérablement. La chute de la somme (sodium + potassium) intracellulaire a évité ce phénomène et nous avons calculé (v. pages 59-60) que la concentration saline intracellulaire demeurait inchangée.

A notre grande surprise, l'eau intercellulaire a varié considérablement: 52 p.100 alors que la valeur trouvée pour la même levure après culture sur milieu normal était de 28 p.100 (v. page 102). Nous

- Tableau n° 27 -

Eau intracellulaire et intercellulaire de *Candida utilis* (souches normale et adaptée) cultivée sur un milieu normal enrichi en chlorure de sodium (1 M/l).

	Poids de culot (en mg) P _I	Poids de l'extrait sec P _I en mg P _I	Poids de culot (en mg) P ₂	Na contenu dans P ₂ (en mg) b	Eau intracel. pour 100 g de levure	Eau intercel. pour 100 g levure humide centrifugée.
	278,8 282 302,3 284,6	70,3 72,7 78 73,1	2075,5 2318,4 2295 2252	25,85 27,60 28,75 28,15	51 53 50 51	54 52 54 54
Souche normale (culture	482,7 489,3 326,2 326,6	124,5 124,6 82,8 78,5	2293 2119 2209 1165	31,28 28,52 30,82 16,10	45 47 44 50	59 58 60 60
âgée de 48 heures)	460,6 514,5 403 425,3	134,6 145,4 116,5 118,9	2706,6 1678,1 2097,9 1498,5	27,14 17,94 22,10 15,64	52 52 51 53	43 46 45 45
	466,5 345,1 465 388,6	125,2 93 123 103	2265 2054 1706 2241	27,3 24,14 21 27,6	50 49 50 49	52 51 51 53
Moyenne des 16 expériences :					49	52
	272,2 321,7 291,4 181,0	74,5 89,6 80,1 49,4	1214,2 1470,5 1522,7 1551,3	12,24 13,66 14,40 14,86	56 57 57 57	43 41 41 41
Souche adaptée au milieu hypersalé (culture	214,1 232,8 202 275,2	57 61,8 53,7 74,6	999,5 1004,6 1105,5 1155,4	9,2 9,9 10,99 10,81	59 58 58 58	40 42 43 41
âgée de 24 heures)	450,7 821,1 465,9 299,4	121 87 128,5 82,9	1508 1936,1 2202,1 2130,7	15,78 19,68 21,1 19,93	55 57 57 52	45 42 41 40
Moyenne des 12 expériences :					57	42

pensons pouvoir attribuer ce fait à ce que les levures cultivées sur milieu hypersalé prennent des formes très variables, souvent irrégulières; aussi se tassent-elles moins régulièrement au cours de la centrifugation et englobent-elles une quantité plus forte d'eau intercellulaire.

b) des cellules de notre souche adaptée à se développer sur milieu nutritif additionné d'une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre et cultivées pendant 24 h sur ce milieu:

Nous avons fait trois expériences en quadruple exemplaire. La moyenne de ces douze expériences donne 57 p. 100 d'eau intracellulaire. Les valeurs extrêmes sont 52 p.100 et 59 p. 100.

Bien que la teneur en eau intracellulaire de la levure adaptée (57 p.100) soit nettement différente de celle trouvée pour la levure normale cultivée dans le même milieu hypersalé (49 p.100), nous ne pensons pas pouvoir dire que le comportement de ces deux souches de *Candida utilis* soit nettement différent. Dans les deux cas, la culture sur milieu hypersalé diminue nettement l'eau intracellulaire; la levure adaptée semble cependant mieux résister à l'augmentation de pression osmotique du milieu extérieur.

c) Action du chlore de sodium sur la teneur en eau des levures non proliférantes:

Après avoir déterminé le pourcentage d'eau intracellulaire des levures mises en culture sur milieu nutritif contenant une molécule-gramme par litre de chlorure de sodium, nous avons essayé de voir s'il était possible de diminuer encore l'eau intracellulaire en les plaçant

en "resting cells" dans des solutions plus concentrées en chlorure de sodium.

Au cours de ces expériences, nous nous sommes demandé si l'âge physiologique de la levure était susceptible d'intervenir sur les résultats. Aussi avons-nous réalisé l'essai suivant: comme dans l'essai précédent, nous avons employé la souche de *Candida utilis* adaptée à proliférer sur milieu hypersalé. Nous l'avons cultivée sur milieu normal additionné d'une molécule-gramme de chlorure de sodium par litre et nous avons récolté une partie de la culture lorsque la densité optique atteignait la valeur 20 et l'autre partie, lorsque la densité optique 70 était atteinte. Sur chacune de ces récoltes, nous avons réalisé un essai en double exemplaire. Après centrifugation et lavages avec une solution moléculaire de chlorure de sodium, nous avons placé ces levures pendant 2 h, soit dans une solution contenant 1 M/l, soit dans une solution contenant 3 M/l de chlorure de sodium.

D'après le tableau n° 28 dans lequel nous avons fait figurer nos résultats, nous voyons que l'eau intracellulaire est légèrement plus élevée pour la levure en fin de croissance que pour la levure jeune. Mais ce qui est surtout frappant est que la concentration en eau intracellulaire de la levure placée sur le milieu le plus concentré en sel est nettement plus faible (33 p.100) que celle de la levure immergée dans la solution monomoléculaire de chlorure de sodium (46 p.100). Nous retrouvons le phénomène déjà signalé à plusieurs reprises: lorsque le milieu extérieur a une tonicité trop forte, la levure perd de l'eau.

Dans les expériences résumées dans le tableau n° 28, nous avons

- Tableau n° 28 -

Eau intracellulaire et intercellulaire de *Candida utilis* (souche adaptée) récoltée à des âges différents et mise en suspension pendant 2 heures dans des milieux contenant I ou 3 M/l de chlorure de sodium.

Récolte à densité optique (x100)	Poids de culot (en mg) P _I	Poids de l'extrait sec P _I (en mg) P _I	Poids de culot (en mg) P ₂	Na contenu dans P ₂ (en mg) b	Eau intra- cel.pour 100 g de levure	Eau inter- cel.pour 100 g.de levure humide cen- trifugée
20 puis mis dans ClNa I M/l	22	6,3	202	2,76	38	59
	76,8	22,3	290,8	3,54	45	53
70 puis mis dans ClNa I M/l	356,3	104,3	964,9	10,58	49	48
	395,1	113,5	1085,5	11,5	52	46
20 puis mis dans ClNa 3 M/l	46,8	17,9	306,1	12,5	32	59
	35,5	13,3	312,9	13,34	30	61
70 puis mis dans ClNa 3 M/l	365,9	143,3	1211,8	46,92	33	57
	299,8	117	1509,9	56,58	36	54

laissé la levure en contact pendant deux heures avec la solution de chlorure de sodium; nous avons voulu voir si un séjour plus long (24 h) dans un milieu à forte concentration en chlorure de sodium (3 M/l) diminuerait davantage encore la teneur de *Candida utilis* en eau intracellulaire. Nos résultats figurent au tableau n° 29.

a) Les cellules provenant de la souche-mère cultivée sur un milieu normal et dont la teneur en eau intracellulaire et intercellulaire était respectivement 73 p.100 et 29 p.100 présentent, après 24 h de séjour dans un milieu non proliférant contenant 3 M/l de chlorure de sodium, des teneurs respectives de 27 p.100 et 59 p.100.

b) Les cellules de la même souche-mère mais provenant d'une culture sur milieu nutritif enrichi en chlorure de sodium (1M/l), après avoir subi le même traitement, présentent des teneurs en eau intracellulaire et intercellulaire du même ordre de grandeur que dans l'expérience précédente: 25 p.100 et 63 p.100 respectivement. Le fait d'avoir réalisé la culture de levure sur un milieu salé auquel elle n'était pas adaptée n'a pas changé le comportement de la levure lorsqu'elle a été placée en "resting cells" dans la solution à 3 M/l de chlorure de sodium.

c) C'est encore des valeurs du même ordre, 29 p.100 et 65 p.100, que nous trouvons lorsque, au lieu d'employer la souche-mère, nous employons la souche adaptée à se développer sur milieu salé.

Au total, lorsque des cellules de *Candida utilis*, quelle que soit leur origine, sont placées pendant 24 h dans une solution contenant 3 M/l de chlorure de sodium, ces levures perdent une très forte

- Tableau n° 29 -

Eau intracellulaire et intercellulaire de *Candida utilis* (souche mère cultivée sur milieu normal et souches mère et adaptée cultivées sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium 1 M/l) placée pendant 24 heures sur une solution de chlorure de sodium 3 M/l.

Origine de la levure	Poids de culot (en mg) P_I	Poids de l'extrait sec P_I en mg P_I	Poids de culot (en mg) P_2	Na contenu dans P_2 (en mg) b	Eau intracel. p.100g de levure	Eau intercel. p.100g de levure humide centrifugée.
Souche mère cultivée sur milieu normal	402,7	158	2660	106,9	30	58
	572	226,4	2250	91,1	28	58
	734,3	312,3	3440	141,4	21	59
	713	278	2982	124,2	28	63
Moyenne des 4 expériences :					<u>27</u>	<u>59</u>
Souche mère cultivée sur milieu hypersalé	204,8	71,3	1215,2	60,72	20	72
	246,8	85,6	1198,7	58	25	70
	253,3	88	1227,1	58	27	68
	375,4	133	1547,9	72	28	67
Moyenne des 4 expériences :					<u>25</u>	<u>63</u>
Souche adaptée cultivée sur milieu ClNa 1M/l	302,9	107	1265,3	59,88	26	69
	283,1	101,1	1075,8	47,46	32	63
	279,1	99,9	1647,6	74,52	29	65
	478,6	175	1517,2	68,16	28	65
Moyenne des 4 expériences :					<u>29</u>	<u>65</u>

proportion de leur eau intracellulaire qui tombe à 27 g p.100 de levure (au lieu de 73); leur eau intercellulaire augmente au contraire (62 p.100 au lieu de 29 p.100), traduisant l'irrégularité des formes des cellules de levure ainsi traitées.

En employant une solution de chlorure de sodium encore plus concentrée (5 M/l au lieu de 3 M/l), dans les mêmes conditions, les valeurs trouvées ont été sensiblement du même ordre de grandeur: l'eau intracellulaire n'a pas nettement diminué.

Nous avons enfin cherché à voir si une cellule appauvrie en eau intracellulaire par passage dans un milieu hypersalé pourrait se réhydrater lorsqu'elle serait plongée dans l'eau pure. Le tableau n° 30 (dans lequel, pour simplifier, nous n'indiquons pas l'origine ni l'âge des levures employées), montre que, dans nos conditions expérimentales, seule une faible réhydratation est possible, indiquant que l'immersion dans la solution pentamoléculaire de chlorure de sodium n'avait pas détruit l'intégrité de la membrane cellulaire.

- Tableau n° 30 -

Candida utilis (souche-mère cultivée sur milieu normal et souche adaptée cultivée sur milieu normal enrichi en chlorure de sodium à 1 M/l) mise en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 5 M/l dans différentes conditions.

	Souche adaptée cultivée sur milieu à 1000meq. de sodium par litre puis mise 24 h. en contact avec une solution à 5000 meq. de sodium par litre.				Souche normale cultivée 24 heures sur milieu normal D.O. 120 mise en contact 24 heures avec une solution à 5000 meq. de sodium par litre.			
			puis mise en contact 2 heures avec l'eau.				puis mise en contact 2 heures avec l'eau.	
	Eau intra-cellulaire	Eau inter-cellulaire	Eau intra-cellulaire	Eau inter-cellulaire	Eau intra-cellulaire	Eau inter-cellulaire	Eau intra-cellulaire	Eau inter-cellulaire
Densité optique (x 100) 30	29-32	61-60	43-50	67-64	39	75	42-36	56-63
Densité optique (x 100) 70	33-32	59-57	32-39	65-64				

Dans ce qui précède, nous avons pu vérifier l'hypothèse que nous avons émise au début de ce chapitre: si les cellules de levure placées sur des milieux hypersalés de concentration de plus en plus forte perdent des ions au lieu d'en acquérir, c'est qu'elles perdent en même temps une partie de leur eau intracellulaire.

L'hypertonie du milieu extérieur provoque une sortie d'eau intracellulaire en même temps que les ions ont tendance à diffuser: alors que les levures, quelle que soit leur origine, cultivées sur le milieu normal ont une teneur en eau de 73 p.100 environ, si elles sont incubées sur un milieu riche en chlorure de sodium (1 M/l), leur teneur en eau s'abaisse à 50 p.100 environ. La cellule cherche à conserver sa teneur normale en eau en luttant contre la diffusion des ions. Nous avons indiqué par avance (pages 59-60) que par ce mécanisme, la teneur de la cellule en milliéquivalents d'ions totaux (somme des ions sodium + potassium), restait constante.

Si nous plaçons les cellules dans des solutions non proliférantes fortement hypertoniques, nous pouvons abaisser encore très considérablement leur teneur en eau: 33 p.100, si le milieu extérieur contient 3 M/l de chlorure de sodium, 27 p.100 environ s'il contient 5 M/l. Nous avons constaté parallèlement, au cours du chapitre IV, que sur ces mêmes milieux, la perte des ions s'accroissait encore.

La réhydratation n'est possible que partiellement.

En outre, l'eau intercellulaire des culots de ces levures est beaucoup plus forte que celle de la levure normale: 50 à 60 p.100 du poids du culot humide contre 27 pour la levure normale si elle est cultivée sur un milieu contenant 1 M/l de chlorure de sodium.

- C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S -

=====

Dans un chapitre introductif, nous avons rappelé les notions et les hypothèses qui concernent la perméabilité des membranes biologiques, envisageant en particulier ce qui a trait au mouvement provoqué des ions sodium et potassium au travers de la membrane cellulaire des levures. A l'heure actuelle, le mécanisme de ces mouvements, qui peuvent même s'exercer contre le gradient des concentrations, est encore mal élucidé.

I - Nous avons tout d'abord défini la souche-mère de *Candida utilis* (HENNEBERG) dont nous sommes partis, indiqué les milieux de culture et les méthodes employés dans notre travail. Puis nous avons relaté nos tentatives d'adaptation de *Candida utilis* à des concentrations élevées de chlorure de sodium; par subcultures sur des milieux à concentration croissante, nous obtenons de manière reproductible une souche qui pousse sur milieu nutritif contenant du chlorure de sodium (1 M/l) beaucoup plus vite et beaucoup mieux que la souche-mère. Bien que ce caractère se conserve après repiquages de la levure sur milieu normal, nous ne pouvons dire que l'adaptation soit totale car

sur milieu hypersalé, la croissance est toujours différée et moins abondante que sur milieu normal.

II - Dans le chapitre II nous avons comparé les respirations de ces deux souches à l'aide de l'appareil de WARBURG et nous avons montré qu'elles ne différaient pas de façon significative. L'une et l'autre, cultivées dans des milieux hypersalés, ont leur intensité respiratoire nettement abaissée, ce que l'on peut rapprocher du ralentissement de croissance que nous avons précédemment indiqué.

III - Dans le chapitre III nous avons rapporté nos résultats concernant la teneur des deux souches étudiées en sodium et en potassium. Nous indiquons la technique de dosage que nous avons suivie et nous en faisons la critique: extraction des ions par ébullition suivie du dosage au photomètre de flamme. La souche-mère que nous avons utilisée, après culture sur milieu normal, contient 0,90 mg de sodium par gramme de levure sèche (Déviation standard $\pm$ 0,43 mg/g) et 16,50 mg/g de potassium (Déviation standard $\pm$ 5,10 mg/g). Par culture de cette souche-mère sur milieux enrichis en chlorure de sodium, sa teneur en ions varie: le taux de sodium passe par un maximum puis s'effondre brutalement lorsque la concentration en chlorure de sodium atteint 1 M/l; la teneur en potassium diminue plus précocement et plus régulièrement.

La souche dite adaptée au chlorure de sodium, cultivée sur milieu normal, est en moyenne deux fois plus riche en sodium et aussi riche en potassium que la souche-mère. La culture sur milieux enrichis en chlorure de sodium de la souche adaptée amène une chute du potassium, une augmentation puis une diminution du sodium, comme cela a été noté

pour la souche-mère; mais les phénomènes sont moins nets. En moyenne, cependant, la teneur des deux souches en ions sodium et potassium dans des milieux enrichis en ions sodium et éventuellement en ions potassium, reste du même ordre et ne permet pas de noter un comportement nettement différent entre la souche-mère et la souche adaptée à proliférer sur milieu hypersalé.

IV - L'étude de la teneur en sodium et en potassium de *Candida utilis* dans différentes conditions expérimentales fait l'objet du chapitre IV.

Des dosages effectués sur des cultures différentes d'âges différents montrent que la prolongation de la culture sur milieu normal modifie peu la teneur des levures en sodium et en potassium; sur milieu hypersalé, la levure atteint rapidement sa teneur normale en sodium, mais au bout de 48 à 72 h de culture, cette teneur diminue beaucoup, ce qui est sans doute en rapport avec la diminution de vitalité de la culture.

La mise en suspension de *Candida utilis* dans des solutions concentrées en chlorure de sodium additionnées de glucose et de phosphate monopotassique ne permettant pas la prolifération, provoque un enrichissement en sodium et une fuite de potassium, mais les deux phénomènes ne sont ni stoechiométriques, ni simultanés; au bout d'un certain temps de mise en suspension dans ces solutions, le taux de sodium baisse brutalement; en absence comme en présence de glucose et de phosphate monopotassique, *Candida utilis* placée en "resting cells" dans des milieux hypersalés s'enrichit en sodium et perd du potassium, mais nous n'avons pas pu déceler l'influence du glucose et du phosphate monopo-

tassique sur le mouvement des ions.

D'autre part, l'addition de stéroïdes ou de métabolites n'apporte aucun changement au comportement de *Candida utilis* en milieu hypersalé si ce n'est le saccharose qui agit par sa pression osmotique.

V - Nous avons pensé que la brutale chute du sodium notée dans les levures placées dans des milieux très riches en chlorure de sodium était concomitante d'une perte d'eau intracellulaire, ce qui serait pour la levure un moyen de lutter contre l'augmentation de pression osmotique du milieu extérieur. Pour le vérifier, nous avons dosé l'eau intracellulaire et par la même occasion l'eau intercellulaire de la levure.

Après avoir indiqué les méthodes analytiques que nous avons suivies, nous montrons que la souche-mère et la souche adaptée cultivées sur milieu normal ont une teneur identique en eau intracellulaire, 73 p.100, et en eau intercellulaire, 28 p.100 (page 102); ces mêmes souches, cultivées dans un milieu contenant du chlorure de sodium (1 M/l), ont une teneur de 49 p.100 d'eau intracellulaire et 52 p.100 d'eau intercellulaire dans le cas de la souche-mère (page 107) et 57 p.100 d'eau intracellulaire et 42 p.100 d'eau intercellulaire dans le cas de la souche adaptée (tableau n° 27, page 108.)

La diminution de l'eau intracellulaire va de pair avec la baisse du sodium et du potassium de sorte que la pression osmotique est maintenue. Cette double sortie d'eau et de sels permet à la levure de résister à l'hypertonie du milieu dans lequel elle a été plongée. Ces phénomènes s'accusent encore par emploi de solutions plus concentrées en chlorure de sodium: 27 p.100 d'eau intracellulaire et 59 p.100

d'eau intercellulaire pour la souche-mère, 29 p.100 d'eau intracellulaire et 65 p.100 d'eau intercellulaire pour la souche adaptée lorsqu'elles sont placées dans une solution de chlorure de sodium (3 M/l).

Au total, notre souche partiellement adaptée, en dehors de sa possibilité de se développer plus vite et davantage que la souche normale dans des milieux enrichis en chlorure de sodium, ne présente pas de caractères nettement différents de ceux de la souche-mère; l'une et l'autre subissent des variations du même ordre en sodium, potassium et eau lorsqu'elles sont cultivées ou plongées dans des milieux enrichis en chlorure de sodium; en particulier si la concentration en chlorure de sodium est égale ou supérieure à 1 M/l, non seulement le potassium, mais encore le sodium et l'eau baissent beaucoup ce qui permet le maintien de la pression osmotique intérieure quand la pression osmotique extérieure augmente.

- INDEX BIBLIOGRAPHIQUE -

=====

(I-8-I2)

CONWAY (E.J.)

Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 1957, I, 84.

(2)

RENKIN (E.M.), PAPPENHEIMER (J.R.)

Wasserdurchlässigkeit und Permeabilität der Capillarwände. *Ergeb. Physiol.*, 1957, 49, 59-I26.

(3) BOYLE), (4) CONWAY, (5) LEVI, (6) USHING, (7) LING in GELLHORN (E), REGNIER (J.). *La Perméabilité en Physiologie et en Pathologie générale*. Masson et Cie, Paris, 1936.

(9)

OSTERHOUT in WILBRANDT (I9).

(IO)

MACHEBOEUF (M.)

Considérations sur la perméabilité cellulaire. *C.R. Soc. Biol.* 1948, I42, 61.

(II)

MITCHELL (P.)

A general theory of membrane transport from studies of bacteria. *Nature* 1957, I80, I34-6.

(I3-I4-32-33-49-50)

CONWAY (E.J.)

A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.*, 1958, 69, 265.

(I5)

JENNINGS (D.H.), HOOPER (D.C.), ROTHSTEIN (A.)

The participation of phosphate in the formation of a "carrier" for the transport of Mg^{++} and Mn^{++} ions into yeast cells. *J. Gen. Physiol.* 1958, 4I, IOI9-26.

(I6)

ROTHSTEIN (A.)

Enzyme systems of the cell surface involved in the uptake of sugars by yeasts. *Symposia soc. ex. Biol.* 1954, 8, I65-I9I.

(I7)

ROTHSTEIN (A)

The relationship of the cell surface to metabolism. XIII. The cationbinding properties of the yeast cell surface. *Archiv. of Biochem. Biophys.* 1956, 63, n° I, 87-89.

(18)

ROTHSTEIN (A.), HAYES (A.), JENNINGS (D.), HOOPER (D.).-
The active transport of Mg^{++} and Mn^{++} into the yeast cell.
J. Gen. Physiol. 1958, 41, 585.

(19-41)

WILBRANDT (W.)

Permeability and transport systems in living cells. J. Pharm. 1959, 11,
65-79.

(20)

ALBERT (A.)

The relationship between structure and biological activity: some fundamental aspects. Ergebn. Physiol. 1957, 425.

(21)

EDDY (A.A.), RUDIN (A.D.),

News aspects of the structure of the yeast cell wall. J. Gen. Microbiol. GB. 1957, 17, V-VI.

(22-25)

NORTHCOTE (D.H.)

The chemical composition and structure of the yeast cell wall.
Biochem. J. 1952, 51, 232.

(23-26)

KREGER (D.R.)

Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X ray diffraction and solubility tests. Biochem. Biophys. Acta 1954, 13, XI.

(24)

MITCHELL (P.)

Permeation mechanisms in bacterial membranes. Discussion Faraday soc. 1956, 21, 258-65.

(27)

EDDY (A.A.)

The structure of the yeast cell wall. Identification of charged groups at the surface. Proc. Royal soc. B. 1958, 148, 419-32.

(28-53)

CONWAY (E.J.), DOWNEY (M.)

An outer metabolic region of the yeast cell. Biochem. J. 1950, 47, 347.

(29)

CONWAY (E.J.)

A redox pump and the biological excretion of Na + ions. 2^e Congress Intern. Biochem. Paris 1952, 141.

(30-48)

CONWAY (E.J.), RYAN (H.), CARTON (E.)

Active transport of sodium ions from the yeast cell. Biochem. J. 1954, 58, 158.

(31)

CONWAY (E.J.)

Net excretion of the Na + ions from Na-rich muscle and its relation to the Redox Pump Theory. Biochem. J. 1956, 64, 41 P.

(32-33)

Voir (13)

(34)

FOULKES in CONWAY (13).

(35)

FUHRMANN (F.A.)

Transport through biological membranes. Annual Rev. Physiol. 1959, 21, 19-48.

(36)

TOSTESON (D.C.)

Potassium and sodium binding by nucleotides J. cell. Comp. Physiol. 1957, 50, n° 2, 199-202.

(37)

USSING (H.H.)

Ionic movements in cell membranes in relation to the activity of the nervous system. 4^e Congrès intern. Biochem. Vienne 1958 Symposium III.

(38)

CONWAY (E.J.), HINGERTY (D.)

The effects of cortisone, deoxycorticosterone and other steroids on the active transport of sodium and potassium ions in yeast. Biochem. J. 1953, 55, 455-8.

(39)

SCHATZMANN in SOLOMON (42)

(40)

GLYNN (I.M.)

The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol. 1957, 136, 148.

(41)

Voir (19).

(42)

SOLOMON (A.K.), GILL (T.) GOLD (L.).

The kinetics of cardiac glycoside inhibition of potassium transport in human erythrocytes. J. Gen. Physiol. 1956, 40, 327.

(43)

POUCHOL (J.)

Effet de l'association d'un sulfamide et d'un phénol sur la croissance d'une bactérie (E. coli). Thèse Pharm. Nancy, 1950.

(43bis)

HOTCHKISS (R.D.)

The induction of resistance to antibiotics by transformation with desoxyribonucleates. 2^e Congrès Biochimie 1952, Symposium Antibiotiques 40-43.

(44-52)

COOK (A.H.)

The Chemistry and Biology of yeasts. Academic. Press. Inc. New-York, 1958.

(45)

NAIKI (N.), MINAGAWA (T.), ARAKATSU (Y.), ASHIDA (J.)

Studies on the adaptation of yeast to copper IX. Copper combining capacity of resistant cells. Mem. Coll. Science Univ. Kyoto série B, 1954, 21, 87-97.

(45bis)

GERARDIN (C.)

Sur la résistance au mercure d'une levure (Candida utilis).
Obtention d'une souche résistante, ses caractères. Thèse Pharm. Nancy 1958.

(46-47)

TAKADA (H.)

Protoplasmological studies on the yeast cell adapted to high osmotic environment. J. Inst. of Polytechnics, Osaka, 1953, 4, Série D Biologie 17.

(48)

Voir (30).

(49-50)

Voir (13).

(51)

TAKADA (H.)

- Relation of the external sodium concentration to the sodium influx into the yeast cell adapted to sodium chloride.
- The exchangeability of cellular sodium ions in the yeast cell adapted to sodium chloride. J. Inst. Polytechnics, Osaka, 1956, 7, Série D Biologie p. 95 et p. 105.

(53)

Voir (28)

(54)

DRABBLE in COOK (44).

- T A B L E D E S M A T I E R E S -

	<u>Pages</u>
<u>AVANT PROPOS</u>	I
<u>INTRODUCTION</u> : RAPPEL DES NOTIONS CONCERNANT LA PERMEABILITE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES. APPLICATIONS AUX MOUVEMENTS PROVOQUES DES IONS SODIUM ET POTASSIUM CHEZ LES LEVURES.....	1
<u>CHAPITRE I</u> : ETUDE DE LA CROISSANCE DE CANDIDA UTILIS DANS DES MILIEUX CONTENANT DES QUANTITES VARIABLES DE CHLORURE DE SODIUM	15
A)- SOUCHE ET MILIEU DE CULTURE	15
B)- METHODES DE CULTURE	17
C)- GENERALITES SUR LE COMPORTEMENT DES MICROORGANISMES EN PRESENCE DE TOXIQUES, EN PARTICULIER SUR LE COM- PORTEMENT DES LEVURES VIS A VIS DE CERTAINS CATIONS..	19
D)- TENTATIVE D'ADAPTATION DE CANDIDA UTILIS A DES CON- CENTRATIONS ACCRUES EN CHLORURE DE SODIUM	20
<u>CHAPITRE II</u> : COMPARAISON DES RESPIRATIONS DE CANDIDA UTILIS, SOUCHE-MERE ET SOUCHE ADAPTEE A SE DEVELOPPER EN PRESENCE D'UNE CONCENTRATION MOLECULAIRE DE CHLORURE DE SODIUM	30
A)- PRINCIPE DE LA METHODE	31
B)- TECHNIQUE	31
C)- RESULTATS	32
<u>CHAPITRE III</u> : TENEUR EN SODIUM ET POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS SOUCHE-MERE ET SOUCHE ADAPTEE A PROLIFERER EN PRE- SENCE DE FORTES CONCENTRATIONS EN CHLORURE DE SODIUM	41
A)- TECHNIQUE DE DOSAGE	41
B)- ETUDE CRITIQUE DE LA METHODE EMPLOYEE	44
1°) Influence du mode de mise en solution des cations de la levure.....	44
a) Minéralisation	44
b) Ebullition	44
2°) Influence des conditions de lavage des culots de levure: nombre, durée, température	46

C)- TENEUR EN IONS SODIUM ET POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS, SOUCHE-MERE, CULTIVEE SUR DES MILIEUX DE CULTURE DE RICHESSSE VARIABLE EN IONS SODIUM ET POTASSIUM	50
1°) Milieu normal	50
2°) Milieux enrichis en chlorure de sodium	52
a) Milieu contenant 150 milliéquivalents de sodium par litre.....	52
b) Milieu contenant 600 milliéquivalents de sodium par litre.....	54
c) Milieu contenant 1000 milliéquivalents de sodium par litre.....	57
3°) Milieux enrichis en chlorure de sodium et en chlorure de potassium	62
a) Milieu contenant à la fois 75 milliéquiva- lents de sodium et 75 milliéquivalents de potassium par litre	62
b) Milieux contenant 150 milliéquivalents de sodium par litre associés à des quantités variables de potassium	64
D)- TENEUR EN IONS SODIUM ET POTASSIUM DE LA LEVURE ADAPTEE A SE DEVELOPPER SUR UN MILIEU ENRICHI EN CHLORURE DE SODIUM A UNE MOLECULE-GRAMME PAR LITRE LORSQU'ON LA CULTIVE SUR DES MILIEUX DE CULTURE DE RICHESSES VARIABLES EN IONS SODIUM ET POTASSIUM.....	66
1°) Milieu normal.....	66
2°) Milieu normal enrichi à 500 et à 600 milli- équivalents de sodium par litre.....	66
3°) Milieu normal enrichi à 1000 milliéquivalents de sodium par litre	68
4°) Milieu normal enrichi à 1200 milliéquivalents de sodium par litre	71

CHAPITRE IV : VARIATIONS DE LA TENEUR EN SODIUM ET POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

75

A)- INFLUENCE DE L'AGE DE CANDIDA UTILIS SUR SA TENEUR EN SODIUM ET EN POTASSIUM	75
1°) Dosages effectués sur des cultures différentes, d'âges différents.....	76
2°) Dosages effectués sur une même culture à des âges différents	76

B)- INFLUENCE DE L'IMMERSION DE CANDIDA UTILIS DANS DES SOLUTIONS CHLORUREES SODIQUES CONCENTREES SUR SA TENEUR EN IONS SODIUM ET POTASSIUM EN PRESENCE DE GLUCOSE ET DE PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE OU NON.....	78
C)- INFLUENCE DE L'IMMERSION DE CANDIDA UTILIS DANS UN MILIEU ENRICHI EN CHLORURE DE SODIUM SUR SA TENEUR EN IONS SODIUM ET POTASSIUM, EN ABSENCE DE GLUCOSE ET DE PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE	85
D)- INFLUENCE DE L'AGE DES CELLULES DE LEVURE SUR LES VARIATIONS EN SODIUM ET EN POTASSIUM QUE PROVOQUE L'IMMERSION DANS UN MILIEU ENRICHI EN CHLORURE DE SODIUM EN ABSENCE DE GLUCOSE ET DE PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE	85
E)- EVOLUTION DE LA TENEUR EN SODIUM ET POTASSIUM DE CANDIDA UTILIS LORSQU'ELLE EST PLADEE PENDANT 1 A 4 H DANS UN MILIEU GLUCOSE TAMPONNE	87
F)- INFLUENCE DE L'AUGMENTATION DE LA TENEUR DU MILIEU DE CULTURE EN CERTAINS DE SES CONSTITUANTS	91
G)- INFLUENCE DE CERTAINS STEROÏDES	95
 <u>CHAPITRE V:</u> ACTION DU CHLORURE DE SODIUM SUR LA TENEUR EN EAU DE CANDIDA UTILIS	98
A)- DETERMINATION DE L'EAU INTRACELLULAIRE DE LA LEVURE CULTIVEE SUR MILIEU NORMAL: METHODE A LA PEPTONE	101
1°) Estimation de l'eau intercellulaire.....	101
2°) Détermination de l'eau totale	101
3°) Calcul de l'eau intracellulaire	101
4°) Exemple.....	102
5°) Résultats	102
B)- DETERMINATION DE L'EAU INTRACELLULAIRE DES LEVURES CULTEES OU PLACEES SUR DES MILIEUX HYPERSALES	104
1°) Marche d'un essai	105
2°) Exemple d'un calcul numérique	105
3°) Résultats	107
C)- ACTION DU CHLORURE DE SODIUM SUR LA TENEUR EN EAU DES LEVURES NON PROLIFERANTES	109
 <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	117
<u>INDEX BIBLIOGRAPHIQUE</u>	122

UNIVERSITE DE NANCY
FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

présentée par Monsieur Christian FARON

Né le 7 Février 1932, à N A N C Y

Nationalité française,

et portant le titre:

" CONTRIBUTION A L'ETUDE DU COMPORTEMENT D'UNE LEVURE
(Candida utilis)

DANS DES MILIEUX DE TENEUR VARIABLE EN CHLORURE DE SODIUM "

Vu ,

NANCY, le 16 Septembre 1959.

Le Président de thèse,

F. KAYSER

Vu et approuvé

NANCY, le 17 Septembre 1959

Le Doyen de la Faculté,

F. KAYSER.

Vu et permis d'imprimer

NANCY, le 17 Septembre 1959.

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

G. M A Y E R.

